



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Maxime SAHUN

le mardi 17 octobre 2017

Titre :

Développement d'un capteur à base de polymère à empreintes moléculaires pour la quantification de la sphingosine 1-phosphate libre et circulante comme biomarqueur du mélanome cutané

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

LAAS (CNRS-UPR 8001) et CRCT (INSERM-UMR 1037)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Docteur Nathalie ANDRIEU-ABADIE

Docteur Aline CERF

Jury :

Rapporteurs:

Docteur Luminita DUMA, Docteur Olivier SOPPERA, Professeur Carine MASQUEFA

Examineurs :

Docteur Juliette FITREMANN, Professeur Thierry LEVADE

A toute ma famille et à mon grand-père Francis.

Remerciements

Quelques pages ne suffiraient pas pour remercier sérieusement et en détails toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, scientifiquement ou non, au cours de ces trois années de vie et de travail. J'ai opté pour la solution de facilité et j'ai décidé de ne pas citer toutes les personnes nominativement, par crainte d'oublier quelqu'un ! Les nombreuses rencontres que j'ai faites pendant cette période ont été très riches et m'ont apporté énormément de choses.

Je tiens à remercier mes deux directrices de thèse Aline Cerf et Nathalie Andrieu-Abadie pour m'avoir fait confiance dans la conduite de ce projet et pour m'avoir permis de travailler en toute liberté. Je vous remercie de votre patience et de votre soutien. Je vous remercie également d'avoir rendu possible mon introduction dans le monde de la recherche et de m'avoir donné des repères pour bien y évoluer. Vos conseils et vos remarques sont maintenant gravés quelque part et je sens qu'ils me serviront à d'autres occasions. Merci pour ça ! Plus généralement je vous remercie pour votre gentillesse. Sachez que j'ai eu plaisir à vous côtoyer pendant cette courte période. Aline, merci pour ton optimisme à toute épreuve qui tel un rouleau compresseur écrase toutes les difficultés qui se présentent. Grâce à toi je n'ai finalement pas désespéré ! Nathalie, merci pour ta rigueur et ton pragmatisme très appréciable. Ta vision de biochimiste a été très instructive pour l'apprenti biophysicien que je suis.

Je remercie également Christophe Vieu et Thierry Levade, qui ont été associés à cet encadrement, pour leurs qualités humaines et leurs précieux conseils.

Ce projet n'aurait pas été possible sans notre collaboration avec l'équipe de Karsten Haupt à l'Université Technologique de Compiègne. Merci de m'avoir accueilli d'une façon aussi exceptionnelle. Je vous l'ai déjà dit mais les séjours à Compiègne ont été des moments géniaux grâce à vous tous ! Merci Karsten pour ta disponibilité, ton humilité et ta gentillesse, merci Bernadette pour ton implication dans le projet, ta rigueur, ta grandeur d'âme et ta personnalité que j'adore. Plus généralement, merci à tous les autres qui n'ont pas économisé de leur temps et de leur énergie pour m'aider activement ainsi que pour m'intégrer à l'équipe. Je suis très heureux de vous avoir connu.

Un grand merci à Yves Génisson et à Cédric Ayela pour leur rôle dynamique dans mon comité de thèse qui m'a redonné confiance. Merci à Olivier Llopis, Arnaud Fernandez et Gwenaëlle Raimbeaux-Guittier qui ont bien voulu participer à ce projet.

Je remercie chaleureusement Luminita Duma, Olivier Soppera, Carine Masquefa et Juliette Fitremann pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour leur travail de relecture.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe ELiA et de l'équipe 4 avec qui j'ai noué des liens d'amitié forts. Merci à tous et toutes pour votre aide, votre soutien, vos rires, votre bonne humeur et tout le reste, qui est sûrement le plus important mais qu'il n'est pas possible

de traduire par des mots. Vous m'avez accompagné pendant ces trois années et je vous en suis reconnaissant. Vous allez me manquer...

Un grand merci à tous les services des trois laboratoires dans lesquels j'ai travaillé, qui ont rendu ce travail possible. Un merci tout particulier au service de restauration du LAAS dont les plats de qualité ont égayé mon quotidien. Cela va aussi me manquer !!

Merci à tous mes amis pour tous les moments passés ensemble, votre confiance et votre soutien. J'espère que l'on continuera toujours.

Enfin, un grand merci à toute ma famille. Le bonheur et le soutien que vous m'apportez est fantastique. Vous êtes tout ce dont on peut rêver et je mesure la chance qui est la mienne de vous avoir. Fanny, ces années n'auront pas été de tout repos et je tiens à souligner tes qualités immenses et à te remercier pour ton aide précieuse et ton amour.

Résumé

Le mélanome est le plus agressif et le plus sévère des cancers cutanés du fait de son fort potentiel métastatique. Pourtant à ce jour, aucun biomarqueur pour la détection précoce du mélanome n'est unanimement reconnu.

Notre groupe a récemment démontré que le métabolisme du céramide est fortement altéré dès les premiers stades de la maladie, conduisant à l'augmentation de la production d'un dérivé du céramide, la sphingosine 1-phosphate (S1P). La S1P est sécrétée par les cellules du mélanome et a été identifiée comme une molécule majeure du remodelage du microenvironnement tumoral, qui favorise la progression du cancer. De façon physiologique, la S1P circulante se trouve majoritairement sous forme liée aux protéines de haute densité (HDLs), aux protéines de basse et très basse densité (LDLs et VLDLs) ainsi qu'à l'albumine. Les cellules de mélanome pourraient produire de la S1P non liée qui pourrait rendre compte des effets produits par ce lysosphopholipide sur les cellules du microenvironnement tumoral suite à sa fixation sur les récepteurs S1PR présents à la surface des cellules stromales.

Ainsi, cette forme libre de S1P pourrait représenter un nouveau biomarqueur pour la détection précoce du mélanome. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen permettant de la quantifier.

Le but de ce travail interdisciplinaire a été de développer un nouveau capteur basé sur un polymère à empreintes moléculaires (MIP) dans le but de quantifier la S1P libre dans le sang de patients atteints de mélanome.

Cette étude a été réalisée entre l'équipe « Ingénierie pour les sciences du vivant (ELiA) » du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), et l'équipe « Sphingolipides, métabolisme, mort cellulaire et progression tumorale » du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), en étroite collaboration avec l'équipe « Biomimétisme et structures bioinspirées » de l'Université Technologique de Compiègne (UTC).

Dans un premier temps, nous avons synthétisé un nouveau MIP dirigé contre la S1P par une méthode de thermopolymérisation en masse. Nous avons caractérisé puis optimisé ce MIP en effectuant des mesures de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide et des mesures de spectroscopie de fluorescence. Le MIP a été comparé à un NIP (Non Imprinted Polymer) et exposé à des analogues de la S1P afin d'évaluer sa sélectivité.

Dans un second temps, en vue de l'utilisation d'un MIP en tant que couche sensible d'un futur capteur et pour anticiper son immobilisation et sa structuration sur le transducteur, nous avons mis au point un nouveau MIP photopolymérisable en 2D. Ce MIP a d'abord été structuré en motifs par photolithographie sur des surfaces de silicium puis validé par des mesures de microscopie de fluorescence. Le MIP a également été structuré sous la forme de couches minces sur les surfaces actives de capteurs de Microbalance à Cristal de Quartz (QCM) dans le but de le valider par cette méthode sans marquage.

Enfin, nous avons exploré l'utilisation d'une fibre optique recouverte d'une couche de MIP photopolymérisé dans le but de détecter, par spectroscopie infrarouge, la liaison de la S1P avec le MIP à la surface de la fibre.

Abstract

Melanoma is the most aggressive and severe form of cutaneous cancer due to its high metastatic potential. However, to date, no marker for the early detection of melanoma has been unanimously accepted. Our group has demonstrated that ceramide metabolism is strongly altered in melanoma, leading to the overproduction of sphingosine 1-phosphate (S1P), one of its derivatives. S1P is secreted by melanoma cells and has been identified as a critical molecule of tumor microenvironment remodeling that supports cancer progression. Physiologically, circulating S1P is predominantly linked to high density lipoproteins (HDLs), low and very low density lipoproteins (LDLs and VLDLs), as well as albumin. Melanoma cells produce unbound S1P that could be responsible for the effects induced by this lysophospholipid on the tumor microenvironment, as a result of its binding to S1PR receptors present on the surface of stromal cells.

Thus, secreted tumor S1P could represent a new biomarker for the early detection of melanoma. However, there are currently no means to quantify it.

The goal of this interdisciplinary work was to develop a new sensor based on a Molecularly Imprinted Polymer (MIP) in order to quantify unbound S1P present in the blood of melanoma patients.

This study has been conducted between the “Engineering for Life science Applications (EliA)” group at the Laboratory for Analysis and Architecture of Systems (LAAS) and the “Sphingolipids, metabolism, cell death and tumor progression” group at the Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), in strong collaboration with the team “Biomimetism and Bioinspired Structures” of the University of Technology of Compiègne (UTC).

First, we synthesized a new MIP against S1P employing a bulk thermopolymerization approach. The resulting MIP was characterized and optimized by performing both mass spectrometry and fluorescence spectroscopy measurements. It was compared to a Non Imprinted Polymer (NIP) and exposed to S1P analogues to assess its selectivity.

Second, in order to use the MIP as the sensitive layer of a future sensor and prepare its immobilization and structuration onto a transducer, we synthesized a new surface photopolymerizable MIP. This MIP was first structured by photolithography onto silicon substrates and validated by fluorescence microscopy measurements. The MIP was also structured as a thin layer onto Quartz Crystal Microbalance (QCM) chips in order to validate its binding capacities using this label-free method.

Finally, the use of a MIP-coated optical fiber as an infrared sensor was explored, with the aim of detecting S1P in blood using Attenuated Total Reflectance (ATR) spectroscopy.

Index

A : Amplitude

ABDV : 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)

ADN : Adénosine triphosphate

AFM : Atomic Force microscopy ; microscopie à force atomique

ATR : Attenuated Total Reflection ; reflexion totale atténuée

BSA : Albumine de sérum bovin

c : Célérité de la lumière dans le vide, 3.10^8 m.s^{-1}

C1P : Céramide-1-phosphate

CMC : Concentration micellaire critique

CRP : Controlled Radical Polymerization ; polymérisation radicalaire contrôlée

DEAEM : N,N-diethylaminoethyl methacrylate

DLS : Dynamic Light Scattering

eV : Electron volt

EDMA : Ethylène glycol diméthacrylate

EDX : Energie Dispersive de rayons X

f : Fréquence

FEWS : Fiber Evanescent Wave Spectroscopy ; spectroscopie

FTDS : Perfluorodecyltrichlorosilane

FTIR : spectromètre Infrarouge à Transformé de Fourier

h : Constante de Planck,

HDAC : Histones déacétylases

HDL : High Density Lipoprotéine ; lipoprotéines de haute densité

HPLC : High Performance Liquid Chromatography ; chromatographie liquide haute performance

Hz : Hertz

IL : Interleukine

K_d : Constante de dissociation

LC-MS : Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy ; chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LDH : Lactate déshydrogénase

LDL : Low Density Lipoprotéine

LPA : Acide lysophosphatidique

LSA : lipid-bound sialic acid-P

λ : Longueur d'onde (nm)

M : Molaire, mol.L^{-1}

MAPTMS : 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate

MeOD : Méthanol deutéré
MIA : Melanoma Inhibiting Activity
MIP : Molecularly Imprinted Polymer ; polymère à empreinte moléculaire
NIP : Non Imprinted Polymer ; polymère sans empreinte
NSE : Neurone Specific Enolase
OPA : Acide octadecylphosphonique
PC : Phosphatidylcholine
pH : Potentiel hydrogène
PI : Phosphatidylinositol
PE : Phosphatidylethanolamine
PPA : Acide phénylphosphonique
QCM : Quartz Crystal Microbalance ; microbalance à cristal quartz
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPM : Tours par minute
S1P : Sphingosine-1-phosphate
SAM : Self-Assembled Monolayer ; monocouche auto-assemblée
SK : Sphingosines Kinase
SM : Sphingomyéline
SRM : Selected Reaction Monitoring
THF : Tetrahydrofurane
TNF : Tumor Necrosis Factor ; facteur de nécrose tumorale
UV : Ultra-Violet
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Communications scientifiques

Conférences :

- **The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016)**, 26-30 juin 2016, Lund, Suède.
Poster : *“Molecularly imprinted polymer-based sensor for in vivo quantification of free circulating sphingosine-1-phosphate, a biomarker in cutaneous melanoma”*. **M. Sahun**, F. Bokeloh, S. Nestora, A. Fernandez, O. Llopis, B. Tse Sum Bui, K. Haupt, T. Levade, A. Cerf, N. Andrieu-Abadie.
- **PhD Students’ Days BSB doctoral School Toulouse**, 11-15 avril 2016, Toulouse, France.
Présentation orale : *“Sensor based on molecularly imprinted polymers for in vivo quantification of free circulating Sphingosine-1-Phosphate as a potential biomarker in cutaneous melanoma”*. **M. Sahun**, F. Bokeloh, S. Nestora, A. Fernandez, O. Llopis, B. Tse Sum Bui, K. Haupt, T. Levade, A. Cerf, N. Andrieu-Abadie.
- **XXXI ème Journée Chimie-Biologie-Santé de Toulouse (LCC)**, 31 mars 2017, Toulouse, France.
Présentation orale en tant qu’invité : *“Molecularly imprinted polymer-based sensor for quantification of free circulating sphingosine-1 phosphate, a biomarker in cutaneous melanoma”*. **M. Sahun**, F. Bokeloh, S. Nestora, P. Medina-Rangel, B. Tse Sum Bui, K. Haupt, T. Levade, A. Cerf, N. Andrieu-Abadie.

Article :

- **En cours de rédaction** : *“Development of a new molecularly imprinted polymer for the binding of sphingosine 1-phosphate as a biomarker in cutaneous melanoma”*. **M. Sahun**, F. Bokeloh, S. Nestora, P. Medina-Rangel, B. Tse Sum Bui, K. Haupt, T. Levade, A. Cerf, N. Andrieu-Abadie.

Table des matières

Remerciements.....	4
Résumé.....	6
Abstract.....	8
Index	10
Communications scientifiques	12
Chapitre 1 : Contexte et objectifs de la thèse	18
1.1 Cancer, mélanome et sphingosine 1-phosphate	18
1.1.1 Propriétés des cellules cancéreuses.....	18
1.1.2 Le mélanome cutané	19
1.1.2.1 Généralités sur la peau humaine	19
1.1.2.1.1 Définition et rôles de la peau humaine	19
1.1.2.1.2 Structures de la peau humaine.....	20
1.1.2.2 Le mélanome : le cancer cutané le plus agressif.....	22
1.1.2.2.1 Définition	22
1.1.2.2.2 Occurrence, facteurs de risque et types de mélanomes cutanés.....	22
1.1.2.2.3 Dissémination des cellules du mélanome	23
1.1.2.2.4 Diagnostic et traitement du mélanome cutané.....	24
1.1.2.2.5 Les biomarqueurs du mélanome cutané	25
1.1.2.2.5.1 Définition d'un biomarqueur.....	25
1.1.2.2.5.2 Cas du mélanome cutané	26
1.2 La sphingosine 1-phosphate (S1P) comme biomarqueur du mélanome cutané	26
1.2.1 Les sphingolipides.....	27
1.2.2 Métabolisme des sphingolipides et de la S1P	28
1.2.3 Rôles biologiques de la S1P	30
1.2.3.1 Action extracellulaire : les récepteurs de la S1P	30
1.2.3.2 Action intracellulaire : S1P, second messenger dans la cellule	31
1.2.4 Rôle de la sphingosine 1-phosphate dans le cancer.....	32
1.2.5 Rôle de la sphingosine 1-phosphate dans le mélanome cutané	33
1.2.6 Localisation et transport de la S1P	34
1.2.7 Méthodes usuelles de quantification de la S1P.....	34
1.2.7.1 La LC-MS.....	34
1.2.7.2 Les immunoessais	35
1.3 Objectif général de la thèse.....	36
1.4 Description d'un capteur et choix du type de biorécepteur	37
1.4.1 Définition d'un capteur	37
1.4.2 Types de biorécepteurs	38
1.4.2.1 Récepteur d'affinité	38
1.4.2.2 Récepteurs catalytiques	39
1.4.2.3 Récepteurs biomimétiques : les polymères à empreintes moléculaires	40

1.5 Les polymères à empreintes moléculaires	40
1.5.1 Historique	40
1.5.2 Principe général des MIPs	42
1.5.2.1 L'approche non-covalente	43
1.5.2.2 L'approche covalente	44
1.5.2.3 L'approche semi-covalente :	45
1.5.3 Rôle des différents constituants	45
1.5.3.1 Les monomères fonctionnels	46
1.5.3.2 L'agent réticulant	48
1.5.3.4 L'initiateur de polymérisation	49
1.5.3.5 Le solvant	49
1.5.4 Types de polymérisation	50
1.5.5 Méthodes de polymérisation et formes physiques des MIPs	52
1.5.6 Avantages des MIPs	54
1.6 Objectifs spécifiques	55
Chapitre 2 : Synthèse par thermopolymérisation d'un MIP pour la S1P	56
2.1 Introduction	56
2.2 Matériels et méthodes.....	63
2.2.1 Réactifs et matériels	63
2.2.2 Formulations des MIPs	65
2.2.3 Méthode de polymérisation.....	65
2.2.3.1 Préparation de la solution de pré-polymérisation	65
2.2.3.2 Méthode de thermopolymérisation en masse	66
2.2.3.3 Méthode d'extraction de la molécule <i>template</i>	66
2.2.3.3 Méthode de préparation du polymère contrôle NIP (<i>Non Imprinted Polymer</i>)	66
2.2.4 Tests de liaison des MIPs	66
2.2.4.1 Protocole des tests de liaison	67
2.2.4.2 Techniques d'analyse	68
2.2.4.2.1 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	68
2.2.4.2.1.1 Principe général.....	68
2.2.4.2.1.2 Technique et appareils utilisés	68
2.2.4.2.1.2.1 Protocole d'extraction lipidique	68
2.2.4.2.1.2.2 Protocole d'analyse HPLC-MS/MS	69
2.2.4.2.1.2.3 Méthode de calibration par standard interne	69
2.2.4.2.2 Spectroscopie de fluorescence	70
2.2.4.2.2.1 Principe général.....	70
2.2.4.2.2.2 Technique et appareils utilisés	70
2.2.4.2.2.2.1 Protocole d'analyse avec le spectrofluorimètre Fluorolog®	71
2.2.4.2.2.2.2 Protocole d'analyse avec le Varioskan® Flash.....	71
2.2.4.2.2.2.3 Courbes de calibration	71
2.2.5 Préparation des solutions lipidiques	72
2.2.5.1 Solutions de S1P dans le méthanol ou le mélange méthanol/eau	72
2.2.5.2 Solutions de S1P fluorescéine dans le méthanol et le mélange méthanol/eau.....	73
2.2.5.3 Solutions de C1P TopFluor® dans le méthanol et le mélange méthanol/eau	73
2.2.6 Synthèse du monomère (4-acrylamidophenyl)(amino)methaniminium acetate (AB acétate)	73
2.2.7 Etudes par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire	74

2.3 Résultats et discussion 75

2.3.1 Synthèse et optimisation d'un MIP pour la S1P	75
2.3.1.1 Synthèse d'un nouveau MIP pour la S1P	75
2.3.1.2 Test de liaison du MIP-S1P 1	76
2.3.1.3 Evaluation RMN de la stœchiométrie et de la force des interactions	79
2.3.1.4 Optimisation du MIP-S1P 1 à l'aide d'une molécule « <i>dummy template</i> »	81
2.3.2 Evaluation et optimisation de la sélectivité du MIP pour la S1P	86
2.3.2.1 Evaluation de la sélectivité du MIP-S1P 1	86
2.3.2.2 Optimisation de la sélectivité du MIP par différentes stratégies.....	88
2.3.2.2.1 Optimisation de la sélectivité par l'utilisation d'un nouveau monomère fonctionnel	88
2.3.2.2.2 Optimisation de la sélectivité par la combinaison de plusieurs monomères fonctionnels ..	91
2.3.2.2.3 Optimisation de la sélectivité par la modification du solvant du test de liaison	94

2.4 Conclusions et perspectives 95

Chapitre 3 Méthodes de photopolymérisation d'un MIP en surface pour le développement d'un capteur permettant la quantification de la S1P dans un fluide biologique 98

3.1 Introduction 98

3.2 Méthode de photopolymérisation du MIP en surface et validation par des techniques avec et sans marquage100

3.2.1 Matériels et méthodes	100
3.2.1.1 Réactifs et matériels	100
3.2.1.2 Formulation du polymère à empreintes moléculaires.....	102
3.2.1.3 Méthode de polymérisation	102
3.2.1.3.1 Préparation de la solution de pré-polymérisation.....	102
3.2.1.3.2 Méthode de photopolymérisation en surface.....	102
3.2.1.3.2.1 Préparation des substrats	103
3.2.1.3.2.2 Protocoles de photopolymérisation en surface	103
3.2.1.3.3 Procédure d'extraction de la molécule <i>template</i>	105
3.2.1.4 Méthodes de caractérisation des dépôts de polymère à la surface des substrats	105
3.2.1.4.1 Echantillons de silicium.....	105
3.2.1.4.2 Capteurs de QCM.....	105
3.2.1.5 Protocoles des tests de liaison	106
3.2.1.5.1 Test de liaison par microscopie optique de fluorescence	106
3.2.1.5.2 Test de liaison par Microbalance à Cristal de Quartz	107
3.2.1.5.2.1 Présentation de la Microbalance à Cristal de Quartz	107
3.2.1.5.2.1.1 Principe de mesure	107
3.2.1.5.2.1.2 Mise en équation du phénomène et modèles physiques.....	107
3.2.1.5.2.2 Protocole expérimental du test de liaison par QCM	109
3.2.1.6 Préparation des solutions lipidiques	111
3.2.1.6.1 Solutions de S1P	111
3.2.1.6.1.1 Dans le méthanol	111
3.2.1.6.1.2 Dans une solution eau/albumine de sérum bovin (BSA)	111
3.2.1.6.2 Solutions de S1P fluorescéine dans le méthanol	111
3.2.1.7 Méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée.....	112
3.2.1.7.1 Synthèse <i>in situ</i> de l'inifertier dithiocarbamate	112
3.2.1.7.2 Greffage de l'inifertier BDC	112
3.2.2 Résultats et discussion	113

3.2.2.1 Echantillons de silicium	113
3.2.2.1.1 Caractérisation des spots de MIP par microscopie optique	113
3.2.2.1.2 Test de liaison par microscopie optique de fluorescence	115
3.2.2.1.3 Conclusions et perspectives	117
3.2.2.2 Capteurs de microbalance à cristal de quartz	117
3.2.2.2.1 Caractérisation des couches de MIP par microscopie à force atomique.....	117
3.2.2.2.2 Test de liaison par microbalance à cristal de quartz	119
3.2.2.2.3 Conclusions et perspectives.....	126
3.2.2.3 Utilisation de la polymérisation radicalaire contrôlée pour l'optimisation de l'homogénéité de la couche de MIP	126
3.3 Développement d'un capteur pour la quantification de la S1P dans un fluide biologique	130
3.3.1 Spectroscopie infrarouge par onde évanescente à la surface d'une fibre optique (FEWS)	130
3.3.1.1 Spectroscopie dans l'infrarouge moyen	130
3.3.1.2 Spectroscopie par réflexion totale atténuée	131
3.3.1.3 Spectroscopie par onde évanescence à la surface d'une fibre optique	134
3.3.1.3.1 Exemple d'applications dans le domaine médical et choix du type de fibre.....	134
3.3.1.3.2 Augmentation des performances - Couplage avec les MIPs	135
3.3.2 Premières étapes dans le développement du capteur.....	136
3.3.2.1 Choix du matériel	136
3.3.2.2 Résultats préliminaires de spectroscopie infrarouge en mode ATR	138
3.4 Conclusions et perspectives	140
Conclusion générale.....	142
Références bibliographiques	144

Chapitre 1 : Contexte et objectifs de la thèse

1.1 Cancer, mélanome et sphingosine 1-phosphate

1.1.1 Propriétés des cellules cancéreuses

Le terme cancer englobe un groupe de maladies qui se caractérisent par une prolifération et une propagation incontrôlées de cellules anormales.

Soumise à des agressions externes de différentes natures, la cellule saine peut subir des altérations de son ADN qui peuvent conduire au cours du temps à l'apparition de mutations génétiques. Pour protéger l'organisme, il existe plusieurs systèmes cellulaires permettant de repérer puis de réparer ces altérations ou bien de déclencher l'autodestruction de la cellule anormale par apoptose lorsque celles-ci sont trop importantes pour être réparées. Cependant, il peut arriver que ces systèmes de protection fonctionnent mal ou ne fonctionnent plus. La cellule anormale peut alors continuer à se diviser malgré la présence d'altérations génétiques. Si les gènes altérés sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose, la cellule peut se multiplier de façon anarchique, ce qui conduit à la formation d'une tumeur cancéreuse.

Avec le temps, les cellules cancéreuses continuent d'accumuler des mutations génétiques et acquièrent ainsi des nouvelles propriétés qui vont permettre à la tumeur de se développer localement en détruisant les cellules saines. Les propriétés principales des cellules cancéreuses sont leur nature immortelle, la perte de leur fonction biologique d'origine, leur capacité à détourner les ressources locales à leur bénéfice (oxygène, énergie et facteurs de croissance) et enfin, leur faculté à empêcher les défenses immunitaires de l'organisme à les combattre (voir figure 1.1).

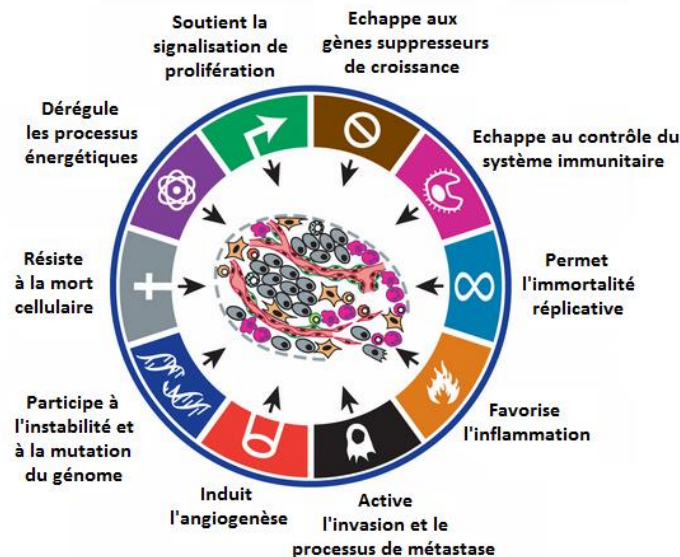


Figure 1.1 : Propriétés principales des cellules cancéreuses (d'après [1]).

Les cellules cancéreuses finissent par envahir tous les tissus de l'organe d'origine de la tumeur mettant en péril son fonctionnement, puis par atteindre les tissus des organes voisins. On parle alors de cancer invasif. Dans ce cas, certaines cellules cancéreuses de la tumeur primaire deviennent mobiles et circulent à travers les systèmes sanguin et lymphatique pour former des métastases. Les décès par cancer sont en grande majorité causés par les métastases, d'où la nécessité de dépister et diagnostiquer au plus tôt la maladie, avant sa dissémination dans l'organisme, afin d'augmenter les chances de guérison [2]–[4].

1.1.2 Le mélanome cutané

1.1.2.1 Généralités sur la peau humaine

1.1.2.1.1 Définition et rôles de la peau humaine

Essentielle à la vie, la peau est l'organe le plus lourd et le plus étendu du corps humain. A titre d'exemple, pour une personne adulte de soixante-dix kilogrammes environ, le poids de la peau est de près de quatre kilogrammes et elle s'étend sur une surface de près de deux mètres carrés, tandis que son épaisseur varie en moyenne de 0,5 à 3 millimètres selon les parties du corps. Elle recouvre la totalité du corps humain et forme une barrière protectrice contre les agressions extérieures telles que le soleil, les virus et bactéries ou encore les agents chimiques. La présence de cellules immunitaires en son sein lui permet de s'adapter continuellement aux agressions extérieures. Cependant, le pouvoir de protection de la peau est limité. Par exemple, suite à une exposition trop importante aux rayons ultraviolets, les cellules de la peau peuvent subir des altérations génétiques qui entraînent l'apparition de cancers de la peau, dont le plus agressif est le mélanome.

1.1.2.1.2 Structures de la peau humaine

La peau est constituée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (voir figure 1.2).

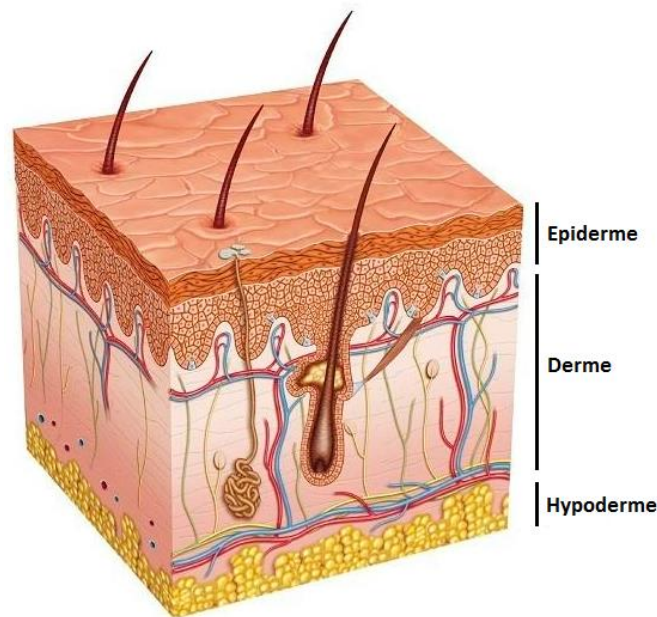


Figure 1.2 : Les principales couches de la peau humaine (d'après [5]).

L'épiderme qui est l'enveloppe externe de la peau s'organise en quatre couches successives qui sont de l'extérieur vers l'intérieur, la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale. Il est constitué de quatre types de cellules qui sont les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (voir figure 1.3). Les mélanocytes sont des cellules d'origine neuro-ectodermique qui se situent au niveau de la couche basale de l'épiderme. Ils synthétisent dans les mélanosomes la mélanine, un pigment brun foncé, responsable de la pigmentation de la peau et qui joue un rôle de protection vis-à-vis des rayons ultraviolets. Lorsque la peau est exposée aux rayons ultraviolets, les mélanocytes qui sont des cellules en forme d'étoile, présentant des prolongements cytoplasmiques, appelés dendrites, entrent en contact avec les kératinocytes pour leur transférer leur mélanosomes (voir figure 1.4). L'épiderme n'étant pas vascularisé il est dépendant du derme pour se nourrir [6], [7].

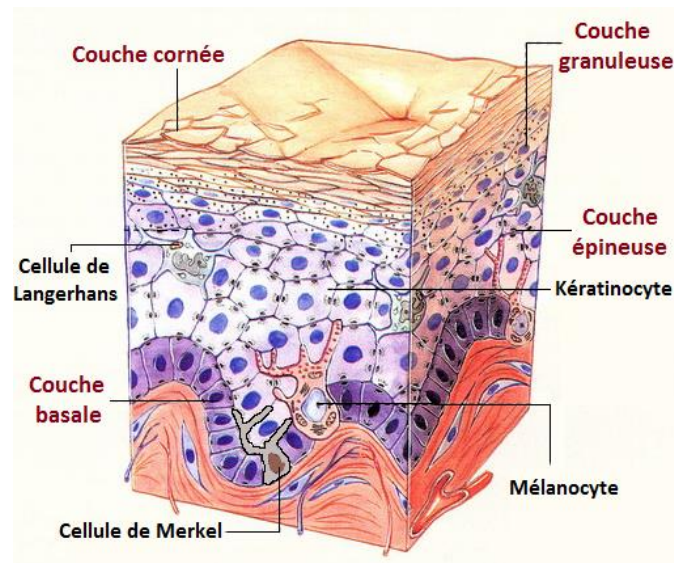


Figure 1.3 : Couches et types cellulaires de l'épiderme (d'après [6]).

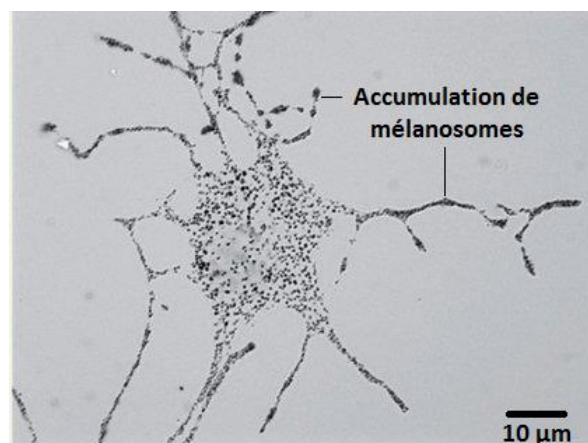


Figure 1.4 : Observation au microscope optique d'un mélanocyte et des mélanosomes accumulés dans les dendrites (d'après [6]).

Le derme qui se situe directement sous l'épiderme est composé de deux couches : le derme papillaire qui est le plus superficiel et le derme réticulaire, le plus profond. Les principales cellules du derme sont les fibroblastes, responsables de la production de fibres de collagène et de fibres élastiques, à l'origine de la souplesse et de l'élasticité de la peau. Le derme est le principal tissu de soutien de la peau, responsable de sa solidité. C'est au niveau du derme que l'on retrouve les principales structures spécialisées de la peau comme les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et les terminaisons nerveuses [8].

L'hypoderme est situé sous le derme. Il est constitué de cellules graisseuses, les adipocytes. Cette couche de graisse stocke l'énergie, assure l'isolation pour conserver la chaleur du corps et protège les organes recouverts [8].

1.1.2.2 Le mélanome : le cancer cutané le plus agressif

1.1.2.2.1 Définition

Le mélanome cutané est une tumeur maligne qui se développe à partir des mélanocytes. Il représente une minorité des cancers de la peau mais il est le plus grave du fait d'un risque important de métastases. En effet, il se développe au niveau des couches les plus profondes de l'épiderme, à proximité du derme, riche en vaisseaux sanguins, ce qui facilite la dissémination des cellules vers d'autres organes, par le biais de la circulation sanguine, et donc la formation de métastases. Cependant, lorsqu'il est détecté assez tôt, au tout début de son développement, le mélanome peut être éliminé par exérèse, d'où l'importance d'un dépistage et d'un diagnostic précoce [8].

1.1.2.2.2 Occurrence, facteurs de risque et types de mélanomes cutanés

Le mélanome cutané survient à tout âge chez les adultes mais est très rare chez l'enfant. Il apparaît sur n'importe quelle partie du corps, le plus souvent sur le tronc chez l'homme et sur les jambes chez la femme. Il se manifeste essentiellement de deux façons : soit par l'apparition d'une tâche pigmentée sur la peau saine qui ressemble à un grain de beauté (cas le plus fréquent), soit par la modification de couleur et de forme d'un grain de beauté préexistant (voir figure 1.5). Dans plus de 90 % des cas, le mélanome se situe au niveau de la peau (il apparaît plus rarement sur d'autres organes comme la bouche, le nez, les sinus, le rectum, ainsi que sur les organes génitaux). Comme tous les cancers, le mélanome cutané est le résultat de différentes causes qui interagissent entre elles. Toutes ne sont pas connues et tous les mécanismes sous-jacents à l'apparition du mélanome cutané ne sont pas encore établis. Cependant, on peut lister certains facteurs de risque internes et externes qui augmenteraient le risque de développer le mélanome cutané. Il s'agit de l'exposition au soleil et aux UVs artificiels, d'un certain type de peau (on parle de phototype), d'un nombre élevé de grains de beauté et des antécédents personnels ou familiaux de mélanome. On distingue quatre types principaux de mélanome cutané : le mélanome superficiel extensif, le mélanome de Dubreuilh, le mélanome acrolentigineux et le mélanome nodulaire [8].



Figure 1.5 : Photographie d'un grain de beauté ayant évolué en mélanome [9].

1.1.2.2.3 Dissémination des cellules du mélanome

Lorsque les cellules cancéreuses apparaissent, elles sont d'abord peu nombreuses et limitées à la surface de la peau. La plupart des mélanomes cutanés se développent d'abord horizontalement dans l'épiderme (sauf le mélanome nodulaire qui peut directement se développer vers les couches profondes de la peau). Tant que la tumeur se situe au sein de l'épiderme, on parle de mélanome cutané *in situ*. Si elle est retirée par acte chirurgical à ce stade, il n'y a pas de risque d'évolution métastatique. Avec le temps et si aucun traitement n'est effectué, la tumeur progresse en profondeur à travers le derme et l'hypoderme. A partir du moment où la tumeur franchit la couche basale et atteint le derme, le cancer devient invasif. Des cellules cancéreuses peuvent alors se détacher de la tumeur primaire et rejoindre les vaisseaux sanguins ou les vaisseaux lymphatiques pour aller envahir d'autres parties du corps. Des cellules cancéreuses peuvent ainsi s'échapper de la tumeur primaire et envahir les ganglions proches. Les ganglions atteints dépendent de la localisation de la tumeur. Les cellules cancéreuses peuvent aussi s'installer dans les canaux lymphatiques situés entre la tumeur primitive et les ganglions les plus proches et former des tumeurs cutanées ou sous cutanées que l'on appelle alors métastases en transit. Enfin, les cellules cancéreuses peuvent se propager à d'autres tissus ou organes. On parle de métastases à distance et le mélanome cutané sera dit métastatique. Les métastases à distance sont le plus fréquemment localisées sur la peau, dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et le cerveau, mais quasiment tous les organes peuvent être atteints (voir figure 1.6) [8].

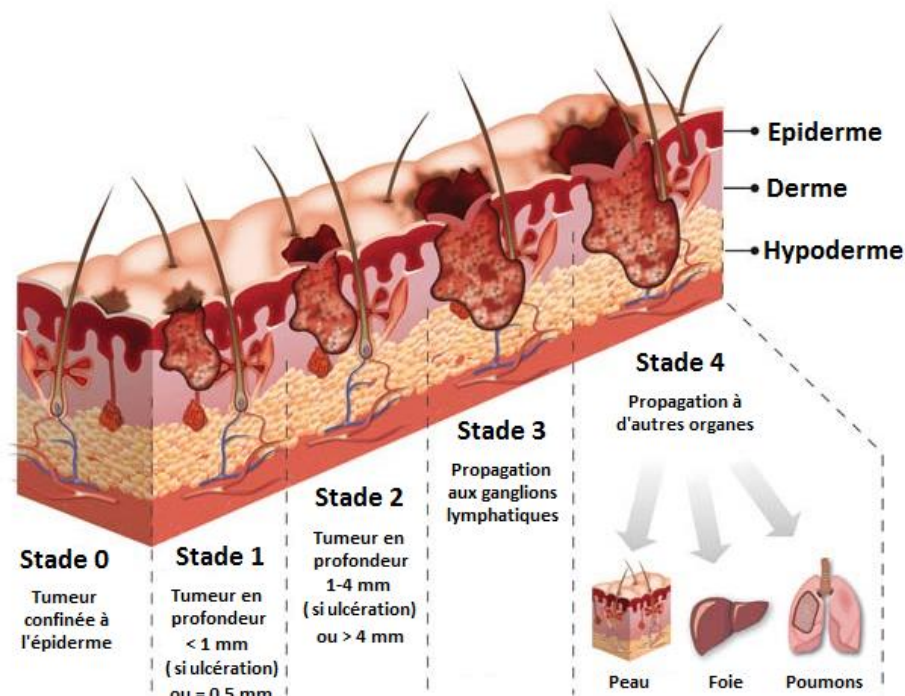


Figure 1.6 : Les différents stades du mélanome cutané (d'après [10]).

1.1.2.2.4 Diagnostic et traitement du mélanome cutané

Le diagnostic clinique consiste en l'analyse par le dermatologue de la taille, de la forme, de la couleur et de l'évolution de la lésion cutanée (voir figure 1.7).



Figure 1.7 : Critères d'identification du mélanome cutané (d'après [11]).

Quand un cas de mélanome cutané est suspecté, une exérèse de la lésion est effectuée afin de l'analyser en laboratoire. Un examen anatomopathologique des tissus prélevés permettra de confirmer le diagnostic [8], [12].

Malheureusement, cette procédure n'est enclenchée que suite à la découverte d'une lésion suspecte de la peau par l'individu lui-même, une personne de son entourage ou par un professionnel de santé (médecins généralistes, dermatologues). Or, lorsque la lésion parvient à être repérée, le mélanome cutané a souvent déjà évolué vers des stades plus agressifs.

Le traitement du cancer est adapté à chaque situation particulière et le choix d'un traitement ou d'une combinaison de traitements dépend de plusieurs facteurs tels que le type de cancer, son degré d'extension, la présence d'autres maladies, l'âge et l'état général de la personne. Parmi les traitements classiques on retrouve la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, la curiethérapie et l'hormonothérapie. Des nouveaux traitements contre le cancer sont en cours de développement, on pourra citer les thérapies ciblées, les immunothérapies, les anti-angiogénèses et les thérapies géniques [13].

Compte tenu du fait que le mélanome cutané peut évoluer rapidement vers un stade métastatique, l'accès à un moyen de dépistage plus précoce, avant même l'apparition d'une lésion de la peau ou d'autres symptômes, constituerait un avantage et un gain de temps considérables pour la prise en charge de cette maladie. Dans ce contexte, l'identification puis la quantification de biomarqueurs du mélanome cutané constituent un enjeu majeur.

1.1.2.2.5 Les biomarqueurs du mélanome cutané

1.1.2.2.5.1 Définition d'un biomarqueur

Dans le domaine de la santé, un biomarqueur est une caractéristique mesurable avec précision et reproductibilité, utilisée comme indicateur d'une fonction du corps, d'une maladie ou de l'action d'un traitement [14].

Dans le cas du cancer en général, il existe un grand nombre de biomarqueurs différents. Ils peuvent renseigner sur le risque de développer ultérieurement certains cancers, sur la présence d'un type de cancer ou bien informer sur la nature et l'agressivité d'une tumeur ainsi que sur la réponse à un traitement. Durant les différentes phases de la cancérogenèse, de nombreuses molécules peuvent être sécrétées soit par les cellules cancéreuses ou les cellules issues du microenvironnement tumoral, soit au travers de phénomènes tels que la mort cellulaire, la réaction du système immunitaire ou la réponse à l'action de molécules chimiothérapeutiques. Il peut s'agir de divers types de molécules biologiques comme des protéines, de peptides, de l'ADN, des micro-ARNs ou des cellules tumorales circulantes. Ces biomarqueurs peuvent être retrouvés dans les tissus, les cellules et dans les fluides biologiques (sang, urine, salive). Ils ne sont pas statiques et leur expression varie au cours du temps en fonction de l'état général du patient, de la progression tumorale et des traitements suivis.

1.1.2.2.5.2 Cas du mélanome cutané

Dans le cas du mélanome cutané, peu de biomarqueurs sont aujourd'hui admis et utilisés en routine. De plus, il n'existe à ce jour aucun biomarqueur employé pour le dépistage du mélanome cutané non métastatique. Les biomarqueurs sérologiques les plus utilisés concernent la détection précoce d'une récurrence locale ou métastatique. Il s'agit de la protéine S100 et de la lactate déshydrogénase (LDH). Parmi les biomarqueurs qui ont été étudiés ou sont en cours d'étude, on peut citer les antigènes associés au mélanome (*melanoma inhibiting activity* (MIA), *neurone specific enolase* (NSE), *lipid-bound sialic acid-P* (LSA)), des dérivés de la différenciation mélanocytaire tyrosinase (TYR), de l'angiogenèse tumorale (*vascular endothelial growth factor* [VEGF], interleukine 8 [IL-8]), des molécules d'adhésion (*intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *soluble vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)), des métalloprotéases, des cytokines ([IL-6], [IL-10]), des antigènes leucocytaires (antigènes membranaires HLA de classe I), ou d'autres difficiles à classer comme le *tumour-associated antigen 90 immune complex* (TA-90) et la glycoprotéine YKL-40. Parmi tous ces biomarqueurs, aucun ne s'est révélé plus efficace que la protéine S100 ou le lactate déshydrogénase comme facteur pronostique des stades métastatiques et aucun n'a montré une pertinence clinique pour le dépistage précoce du mélanome cutané, y compris la protéine S100 et le lactate déshydrogénase [15], [16].

1.2 La sphingosine 1-phosphate (S1P) comme biomarqueur du mélanome cutané

La S1P est un lysophospholipide de formule chimique $C_{18}H_{38}NO_5P$ et de poids moléculaire égal à 379,47 Da qui dérive de la sphingosine. Il s'agit d'une molécule amphiphile, constituée d'une tête polaire phosphate hydrophile rattachée à un groupement amine et d'une longue chaîne carbonée mono-insaturée (présence d'une double liaison carbone-carbone en configuration trans en C4) hydrophobe. A pH physiologique la S1P sera sous sa forme zwitterionique (présence de deux groupes de charge opposée) globalement neutre électriquement (voir figure 1.8) [17]–[19]. La S1P dérive de la phosphorylation de la sphingosine, à ce titre elle est aussi qualifiée de sphingolipide.

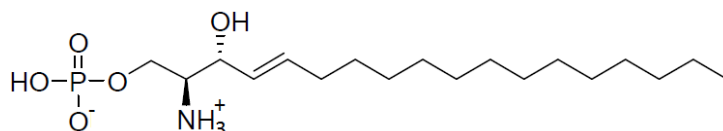


Figure 1.8 : Structure chimique de la S1P.

1.2.1 Les sphingolipides

C'est en travaillant sur la composition du cerveau en 1884 que J.L.W. Thudichum utilise pour la première fois le préfixe « sphingo », inspiré du Sphinx de la mythologie grecque, pour mettre en avant les propriétés énigmatiques des constituants lipidiques qu'il rencontre [20]. En effet, la nature des sphingolipides est longtemps restée mystérieuse du fait de leur grande diversité de structure, de leur métabolisme complexe mais également à cause des nombreuses fonctions biologiques qu'ils régulent. Bien plus tard, en 1947, H. Carter étendra l'utilisation du terme sphingolipides à tous les lipides dérivés de la sphingosine [21]. Les sphingolipides ont en commun une base sphingoïde, qui peut être saturée (dihydrosphingosine) ou insaturée (sphingosine), composée de dix-huit atomes de carbone et d'une fonction aminoalcool. Cette base peut subir des modifications pour donner d'autres sphingolipides. Par exemple, l'ajout d'un phosphate sur le groupement hydroxyle en C1 de la sphingosine aboutit à la formation de S1P. Autre exemple, la condensation de la sphingosine par liaison amide avec un acide gras de longueur variable aboutit à la formation de céramide. Les fonctions biologiques du céramide dépendent de la nature de la chaîne acylée qui le compose et il se situe au centre du métabolisme des sphingolipides. Il est à l'origine de la formation de sphingolipides plus complexes. Ainsi, la phosphorylation par une céramide kinase génère du céramide 1-phosphate (C1P) et la condensation avec une phosphocholine aboutit à la formation de la sphingomyéline (SM). Enfin, les glycosphingolipides tels que le glucosylcéramide et le galactosylcéramide proviennent respectivement de l'addition de résidus de glucose et de galactose sur le céramide (voir figure 1.9) [22], [23]. Comme les autres lipides membranaires, les sphingolipides sont des molécules amphiphiles ce qui leur permet de diffuser à travers les membranes biologiques. Ils se retrouvent dans de nombreux organismes tels que les levures, les insectes, les vers, les poissons et les mammifères. Il s'agit d'une classe de lipides largement distribuée dans les membranes des cellules eucaryotes et on les trouve dans différents compartiments subcellulaires ou parfois dans les liquides biologiques pour certains d'entre eux. Bien qu'ils soient répandus, leur proportion est très variable selon le tissu et le type cellulaire [24].

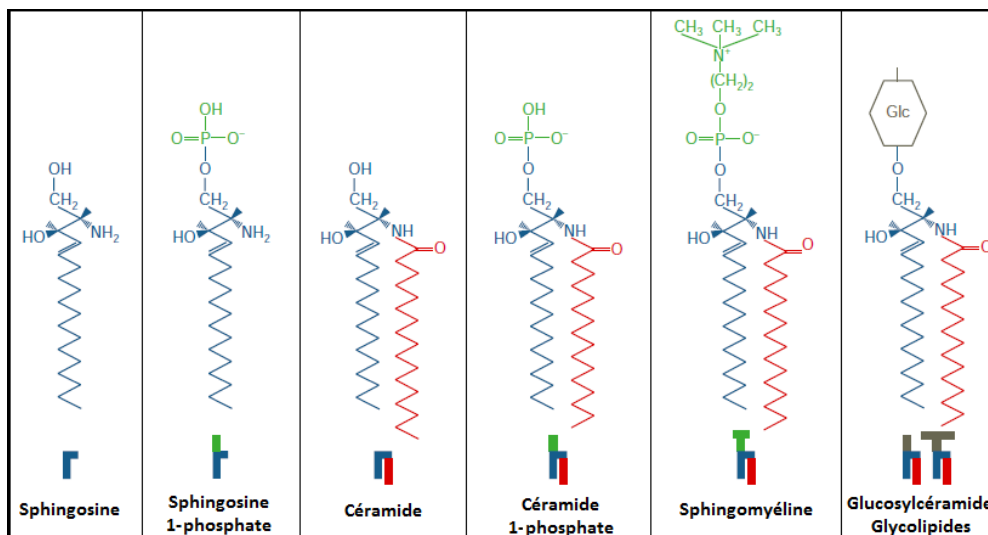


Figure 1.9 : Structure de quelques sphingolipides (d'après [24]).

1.2.2 Métabolisme des sphingolipides et de la S1P

La S1P dérive de la sphingosine qui elle-même est issue du céramide. Le céramide peut être généré soit *de novo* dans le réticulum endoplasmique, soit par une voie de recyclage connue sous le nom de « cycle de la sphingomyéline ».

La première étape de la synthèse *de novo* de céramide est la condensation entre une sérine et un palmitoyl-CoA qui débute sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique et qui est catalysée par la sérine palmitoyltransférase. La 3-cétosphinganine ainsi formée va être réduite en dihydrosphingosine ou sphinganine par la cétosphinganine réductase, une enzyme NADPH dépendante. La dihydrocéramide synthase catalyse alors l'acylation de cette sphinganine pour aboutir à du dihydrocéramide qui sera ensuite oxydé par une désaturase pour générer du céramide.

Les futures transformations du céramide en sphingolipides plus complexes auront lieu dans des compartiments cellulaires extérieurs au réticulum endoplasmique, principalement dans l'appareil de Golgi. Pour cela, le céramide doit pouvoir être transporté vers ces compartiments. Cela n'est rendu possible que grâce à une protéine cytosolique, la *ceramide transfert protein* qui joue le rôle de transporteur. Une fois dans le Golgi, la sphingomyéline synthase catalyse le transfert d'un groupement phosphorylcholine à partir de phosphatidylcholine sur le céramide, ce qui permet de former de la sphingomyéline qui sera transportée jusqu'à la membrane plasmique. Son hydrolyse qui génère du céramide et de la phosphorylcholine grâce à des phospholipases spécifiques, les sphingomyélinases, constitue la deuxième voie de génération de céramide. Enfin, il se pourrait que des réactions d'hydrolyse similaires à cette dernière puissent générer du céramide à partir d'autres sphingolipides plus complexes, notamment les glycosphingolipides [25]. Une fois synthétisé, le céramide peut subir une déacylation par des céramidases qui sont des enzymes qui catalysent la dégradation

du céramide en sphingosine. Cette sphingosine peut être phosphorylée par les sphingosines kinases situées dans le cytosol ou sur la membrane plasmique et donner de la sphingosine 1-phosphate. Cette sphingosine 1-phosphate peut être recyclée en sphingosine sous l'action d'une S1P phosphatase ou bien être dégradée dans le RE de façon irréversible par la S1P lyase, produisant au final un hexadécénal et une phosphoéthanolamine qui serviront à la synthèse des glycérophospholipides (voir figure 1.10) [26]. Ainsi les taux intracellulaires de S1P sont relativement faibles et variables selon les tissus et ils sont finement régulés par trois types d'enzymes, les sphingosines kinase (SK1 et SK2), la S1P lyase et les S1P phosphatase (SPP1 et SPP2) qui orchestrent l'équilibre entre biosynthèse et dégradation de la S1P (voir figure 1.11) [17].

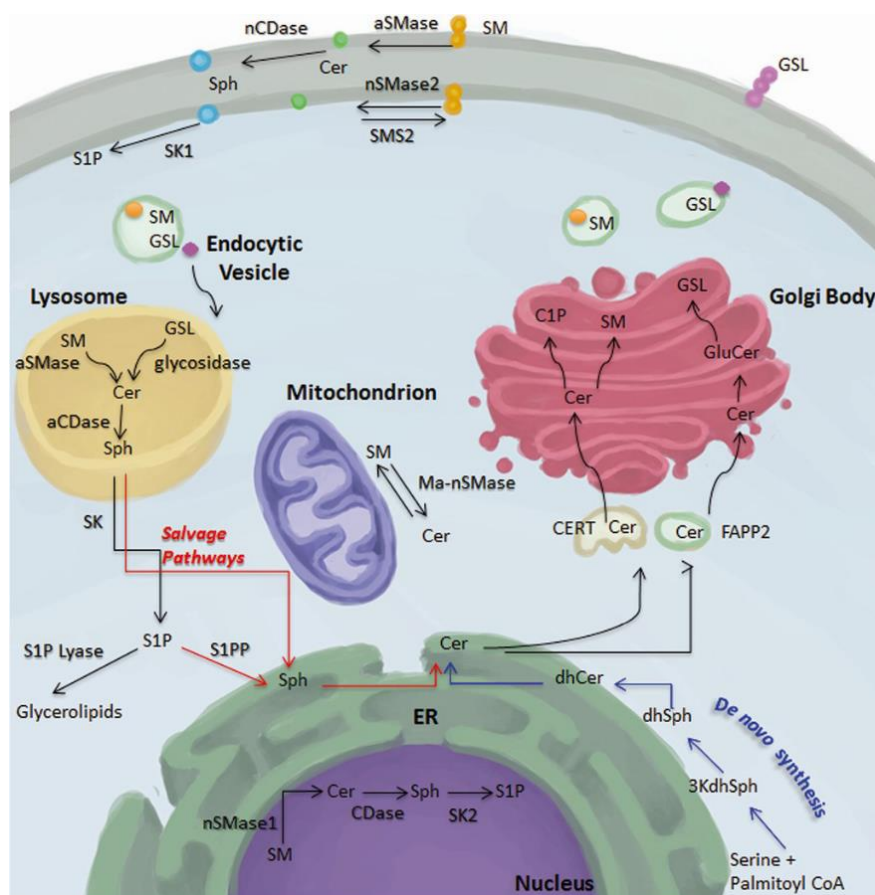


Figure 1.10 : Métabolisme et localisation subcellulaire des sphingolipides et de la S1P.
 Abréviations : CDase céramidase, aCDase CDase acide, nCDase CDase neutre, CerS céramide synthase, Des desaturase, DHCer dihydrocéramide, EtP ethanolamine phosphate, FA fatty acid, GlcCer glucosylcéramide, GSL glycosphingolipide, Hal hexadécénal, KS ketosphinganine, KSR KS reductase, Sa sphinganine, Ser L-serine, SK sphingosine kinase, SM sphingomyéline, SMase sphingomyélinase, aSMase SMase acide, SMS SM synthase, So sphingosine, SPL S1P lyase, SPT sérine-palmitoyltransferase, S1P sphingosine 1-phosphate [27].

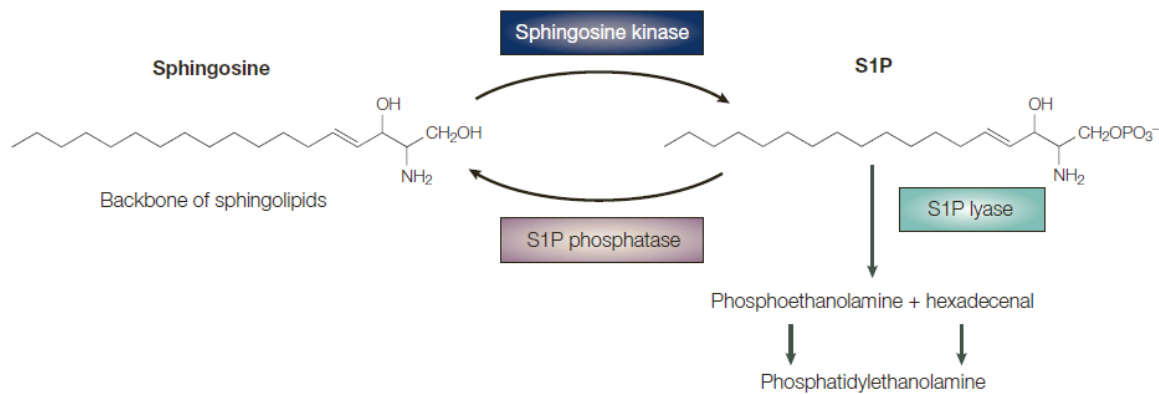


Figure 1.11 : Formation et dégradation de la S1P [17].

1.2.3 Rôles biologiques de la S1P

Les sphingolipides ont longtemps été étudiés pour leur rôle structural dans les membranes cellulaires et la S1P a été considérée comme un simple intermédiaire de détoxification de la sphingosine. En réalité, il s'agit d'un lipide bioactif et un médiateur lipidique vital, dont le rôle dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques a été démontré. Par exemple on peut citer son implication dans la régulation de la croissance cellulaire, l'angiogenèse vasculaire, la migration lymphocytaire, la réponse inflammatoire, la fibrose et son effet anti-apoptotique. La S1P agit selon deux modes d'action différents : l'un extracellulaire, par fixation à des récepteurs présents à la surface cellulaire, l'autre intracellulaire, en tant que second messager dans la cellule.

1.2.3.1 Action extracellulaire : les récepteurs de la S1P

Une fois sécrétée, la S1P peut se lier à des récepteurs spécifiques à la S1P (S1PRs) en agissant de façon autocrine ou paracrine. Suite à cette liaison, la S1P active des cascades de signalisation qui sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. Aujourd'hui, cinq récepteurs spécifiques à la S1P (S1PR1-5) sont connus (voir figure 1.12). S'ils présentent tous une forte affinité pour la S1P (K_d de 2 à 63nM), ils ont des profils d'expression cellulaire différents et des modes d'action parfois antagonistes en réponse à la S1P. L'effet biologique observé en réponse à la S1P représente au final la somme de toutes leurs actions. Il s'agit de récepteurs EDG (*Endothelial Differentiation Gene*) possédant sept domaines transmembranaires et couplés à une protéine G. Lors de la liaison avec la S1P, le récepteur interagit avec une protéine G hétérotrimérique qui se dissocie en sous-unités α -GTP et $\beta\gamma$ qui sont capables d'activer différents effecteurs cellulaires. Après leur activation par la S1P, les

récepteurs sont phosphorylés, ce qui conduit à leur découplage fonctionnel puis à leur recyclage vers la membrane plasmique [28].

Récepteur	Expression tissulaire	Principaux rôles biologiques
S1P₁	Cellules endothéliales Cellules musculaires lisses Cellules immunitaires (dendritiques, macrophages, éosinophiles, mastocytes, lymphocytes T, lymphocytes B, NK, NKT) Cellules neuronales (astrocytes, oligodendrocytes) Cardiomyocytes	Angiogenèse Intégrité endothéliale Circulation lymphocytaire Migration Neurogenèse Survie à l'ischémie-reperfusion des cardiomyocytes
S1P₂	Cellules immunitaires (dendritiques, macrophages, éosinophiles, mastocytes, NKT) Cellules musculaires lisses Cardiomyocytes	Système vestibulaire et auditif Régulation du tonus vasculaire (contraction) Excitabilité neuronale Inhibition de la migration Dégranulation des mastocytes Survie à l'ischémie-reperfusion des cardiomyocytes
S1P₃	Cellules immunitaires (dendritiques, éosinophiles, lymphocytes B) Cellules endothéliales Cellules musculaires lisses Cardiomyocytes Cellules neuronales (astrocytes, oligodendrocytes)	Régulation du rythme cardiaque Régulation du tonus vasculaire (relaxation) Survie à l'ischémie-reperfusion des cardiomyocytes
S1P₄	Cellules immunitaires (dendritiques, lymphocytes T, NKT)	Migration des cellules dendritiques
S1P₅	Cellules immunitaires (dendritiques, NK) Cellules neuronales (oligodendrocytes)	Survie des oligodendrocytes matures myélinisants

Figure 1.12 : Les différents récepteurs de la sphingosine 1-phosphate [28].

1.2.3.2 Action intracellulaire : S1P, second messenger dans la cellule

Plusieurs observations sont en faveur d'un rôle direct de la S1P à l'intérieur de la cellule. Dans la cellule, elle occupe une place importante dans le métabolisme des sphingolipides puisque sa dégradation constitue la principale voie de dégradation des bases sphingoides. De plus, la mise en évidence de son implication dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de la croissance cellulaire, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose suggère pour

la S1P un rôle de second messenger intracellulaire. Par exemple, des études ont montré que dans un modèle de tumeur intestinale chez des souris déficientes pour la sphingosine kinase 1 ou pour certains récepteurs à la S1P, seules les souris invalidées pour la kinase montraient une régression tumorale, soulignant l'importance de l'action intracellulaire de la S1P [29]. D'autres travaux ont permis de montrer que la S1P était capable de réguler l'acétylation des histones en se liant spécifiquement aux histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 et en inhibant leur activité enzymatique. Ces travaux soulignent l'importance de la S1P dans la régulation de la transcription génique par son interaction directe avec les HDAC [30]. Une étude a également montré que la production de S1P à la membrane externe des mitochondries par la sphingosine kinase 2 facilitait l'oligomérisation du gène pro-apoptotique Bak et un lien direct entre l'hexadécénal, qui est un produit de dégradation de la S1P et Bax, un autre membre pro-apoptotique de la famille de gènes Bcl-2 a été démontré [31], [32]. Enfin, dans une autre étude, il a été découvert que le facteur-2 associé au récepteur du TNF (TRAF2), un acteur clé dans la signalisation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B) impliquée dans la réponse immunitaire et notamment associée aux facteurs anti-apoptotiques pouvait se lier directement avec la S1P intracellulaire [30].

1.2.4 Rôle de la sphingosine 1-phosphate dans le cancer

Les sphingolipides sont étroitement liés à la pathologie tumorale. Dans une cellule saine, il y a un équilibre dynamique entre la synthèse de métabolites sphingolipidiques mitogéniques (qui incitent à la division cellulaire) et ceux qui au contraire induisent la mort cellulaire. Ainsi, le céramide et la sphingosine sont reconnus pour être des métabolites pro-apoptotiques alors que leur homologues phosphorylés ou glycosylés (S1P, C1P, GlcCer) soutiennent la prolifération et la survie cellulaire ainsi que la chimiorésistance. Pour illustrer cet équilibre entre les concentrations intracellulaires de céramide et celles de S1P, on évoque souvent le terme de « rhéostat sphingolipide » (voir figure 1.13).

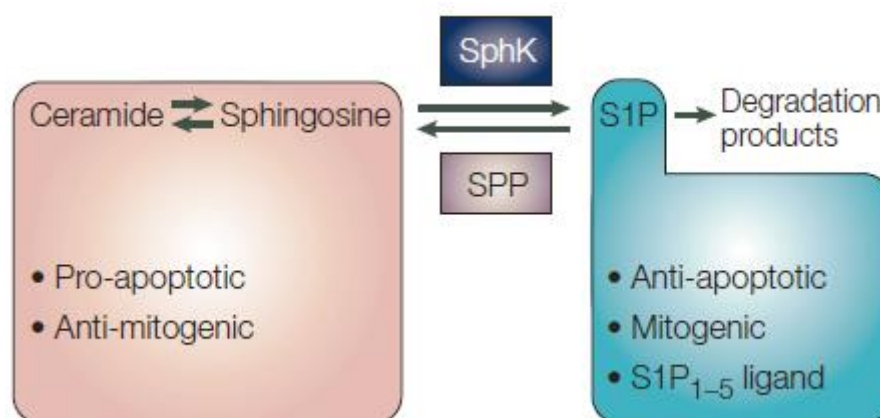


Figure 1.13 : Le rhéostat sphingolipidique. Abréviations : SphK sphingosine kinase, SPP S1P phosphatase [17].

Dans la cellule tumorale, cet équilibre est rompu en faveur d'une augmentation des taux de S1P et au détriment de ceux du céramide qui voit sa production diminuer [33]. Plusieurs études ont démontré que le métabolisme de la S1P est modifié dans le cancer. Ainsi, il a été décrit des altérations des enzymes de synthèse (SK1, SK2) et de dégradation (S1P Lyase, S1P phosphatases) de la S1P permettant l'accumulation de S1P dans la cellule tumorale [34]. Ces modifications favorisent la prolifération, la transformation et la migration cellulaire. Dans le microenvironnement, la S1P induit l'inflammation, la fibrose et l'angiogenèse [33]. Plusieurs travaux ont établi un lien entre des fortes concentrations de S1P dans la tumeur et l'augmentation de la résistance à l'apoptose induite par chimiothérapie [35]. Il a été montré également que l'expression des récepteurs à la S1P est augmentée dans les cancers [36]–[38]. Il existe d'ailleurs des thérapies anti-tumorales visant le métabolisme de la S1P avec pour objectif soit de limiter ou d'empêcher la synthèse de la S1P, soit d'en bloquer les effets, ou encore de favoriser et d'accélérer sa dégradation [36], [39]

1.2.5 Rôle de la sphingosine 1-phosphate dans le mélanome cutané

Même si tous les mécanismes moléculaires mis en jeu n'ont pas encore été élucidés, plusieurs études montrent que la S1P pourrait être impliquée dans le développement du mélanome cutané.

En effet, l'injection d'un anticorps monoclonal dirigé contre la S1P à des souris préalablement greffées avec des cellules de mélanome murin B16-F10 a eu pour conséquence de réduire le volume et la vascularisation de la tumeur formée [40]. Des résultats similaires ont été rapportés suite à l'injection intratumorale du sphingolimod (FTY720), un médicament qui est reconnu pour sa capacité à mimer la S1P et agir comme antagoniste du récepteur S1P1 présent à la surface des cellules de la peau [41].

De plus, des taux intracellulaires de S1P élevés, et à l'inverse, des taux intracellulaires de céramide diminués semblent impliqués dans l'augmentation de la résistance de lignées de mélanome humain à l'apoptose [42].

Par ailleurs, l'équipe 4 du CRCT a récemment découvert des nouvelles altérations du métabolisme du couple céramide/S1P dans les cellules de mélanome humain en comparaison à des mélanocytes sains. Dans le cas du mélanome, la S1P lyase, responsable de la dégradation irréversible de la S1P est sous exprimée alors que l'expression de la sphingosine kinase 1, qui produit la S1P est augmentée. Cette altération a pour effet d'augmenter les niveaux de S1P dans les cellules du mélanome, ainsi que dans le microenvironnement tumoral par rapport aux mélanocytes présents dans une peau saine [43], [44].

1.2.6 Localisation et transport de la S1P

Chez l'homme, c'est dans le sang que l'on retrouve les plus grandes concentrations de S1P. Dans le plasma sanguin, la concentration de S1P est comprise entre 0,2 et 1 μM . La S1P circulerait majoritairement dans le plasma sous une forme liée aux lipoprotéines de haute densité (55 %) via une liaison non-covalente avec l'apoprotéine M, à l'albumine (35 %) et dans une moindre mesure aux lipoprotéines de basse et très basse densité (< 10 %) [45]–[48]. Il existe aussi une fraction minoritaire de S1P sous forme libre dont la concentration a été estimée entre 15 et 45 nM dans le sang par Oldstone *et al.*, [49] et à 11,2 nM dans le sérum et 7,3 nM dans le plasma humain par Murata *et al.*, [50]. Sa quantité pourrait varier en fonction des conditions physiopathologiques. Par exemple, Sattler *et al.*, ont montré qu'il existe des différences de propriétés importantes entre la S1P libre et la S1P liée aux lipoprotéines de haute densité et que la S1P libre avait un impact majeur sur de nombreux effets biologiques en lien avec les maladies cardiovasculaires [51].

Les taux de cette forme libre de S1P qui est sécrété par les cellules tumorales, et notamment les cellules du mélanome pourrait être fortement augmentés au niveau sanguin. Cette S1P libre pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'activation des récepteurs de la S1P (S1PRs). Murata *et al.*, [50] ont notamment émis l'hypothèse que la liaison de la S1P avec les lipoprotéines du sérum ou du plasma pourrait interférer dans la liaison de la S1P avec ses récepteurs, suggérant l'action particulière de la S1P libre.

L'hypothèse est donc posée que la S1P libre et circulante pourrait être considérée comme un biomarqueur du mélanome cutané et que sa quantification pourrait permettre le dépistage précoce de la maladie.

1.2.7 Méthodes usuelles de quantification de la S1P

Il existe aujourd'hui deux méthodes utilisées en routine pour la quantification de la S1P dans le sang. Il s'agit de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et des tests d'immunoessais.

1.2.7.1 La LC-MS

La LC-MS est une technique de chimie analytique qui combine les capacités de séparation physique et chimique de la chromatographie en phase liquide avec la faculté de la spectrométrie de masse à séparer des espèces préalablement ionisées selon leur rapport masse/charge. Plus précisément, la chromatographie en phase liquide repose sur la séparation d'espèces présentes dans une phase mobile, suite à des interactions physiques ou chimiques avec le solide divisé (phase stationnaire) qu'elles traversent. La spectrométrie de masse permet quant à elle de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse ainsi que de caractériser leur structure chimique. Le seuil de

sensibilité de cette technique pour la quantification de la S1P est de l'ordre de 10 nM, soit environ 20 fois inférieure à la plus faible concentration physiologique dans le sang (entre 200 et 1000 nM) [52] mais elle ne permet pas de distinguer la forme libre de la forme liée. De plus, les mesures LC-MS nécessitent des équipements lourds et sont souvent réalisées par du personnel technique qualifié, au sein d'une plateforme dédiée et la préparation des échantillons à analyser est parfois laborieuse. Ainsi, les mesures de LC-MS prennent beaucoup de temps, sont coûteuses et non adaptées à une application *point-of-care* car non portable.

1.2.7.2 Les immunoessais

Les immunoessais sont des tests biochimiques qui mesurent la présence ou la concentration d'une espèce dans un échantillon liquide donné. Ils reposent sur le principe de reconnaissance immunologique entre un anticorps et un antigène. La société Echelon Bioscience® a développé un kit de détection de la S1P basé sur un anticorps monoclonal murin anti-S1P mis au point par O'Brien et ses collaborateurs et dont le brevet est exploité par Lpath Inc. [53].

Malheureusement, ces tests sont assez chers, relativement peu stables, utilisables une seule fois et demandent de suivre un protocole de mise en œuvre préétabli parfois long et contraignant. Surtout, les immunoessais ne sont pas spécifiques de la S1P et peuvent aussi reconnaître ses analogues structuraux comme la dihydrosphingosine 1-phosphate et la Sphingosyl phosphorylcholine [40].

1.3 Objectif général de la thèse

Nous venons de voir qu'aucun biomarqueur pour la détection précoce du mélanome n'est unanimement reconnu et que la forme libre de S1P, sécrétée par les cellules du mélanome pourrait constituer un nouveau biomarqueur du fait de son rôle privilégié dans l'activation des récepteurs à la S1P (S1PRs). Cependant, les méthodes de quantification de S1P actuelles sont limitées, l'une ne permettant pas de différencier la forme libre de la forme liée et l'autre n'étant pas sélective.

Dans l'objectif de pallier le manque de méthode de quantification adaptée nous avons souhaité travailler au développement d'un nouveau capteur. Celui-ci devra être capable de distinguer la forme libre de la forme lié et de permettre la quantification sélective de la S1P d'un poids moléculaire de 380 Da présente dans le plasma sanguin à des concentrations estimées entre 7,3 et 45 nM. Enfin, les caractéristiques pratiques du capteur (dimension, portabilité, biocompatibilité) devront être adaptées à son utilisation dans la quantification de la S1P en routine clinique.

1.4 Description d'un capteur et choix du type de biorécepteur

1.4.1 Définition d'un capteur

Un capteur est un outil qui répond à un stimulus physique ou chimique dans le but de produire un signal de détection mesurable ou de contrôler une autre opération. Les capteurs sont rencontrés dans des domaines très variés et font aujourd'hui partie intégrante de notre vie quotidienne.

Alors que le développement de capteurs pour des stimuli physiques externes est relativement simple, cela devient plus compliqué quand les stimuli proviennent d'atomes ou de molécules. Dans ce dernier cas, on parle alors de capteurs chimiques, biochimiques ou de biocapteurs.

Un biocapteur est défini comme un dispositif de mesure qui utilise une entité biologique (enzyme, anticorps, antigène cellules, ADN, ARN, etc.) pour détecter et quantifier un analyte spécifique. L'analyte cible peut être une espèce chimique ou biologique. Le biocapteur est obtenu par la combinaison d'un biorécepteur (couche sensible) qui assure la reconnaissance et la liaison de la molécule cible et d'un transducteur (mode de détection) qui transforme le phénomène chimique, biologique ou physique observé en signal électrique mesurable. Une étape de conversion et d'amplification peut aussi être nécessaire (voir figure 1.14) [54].

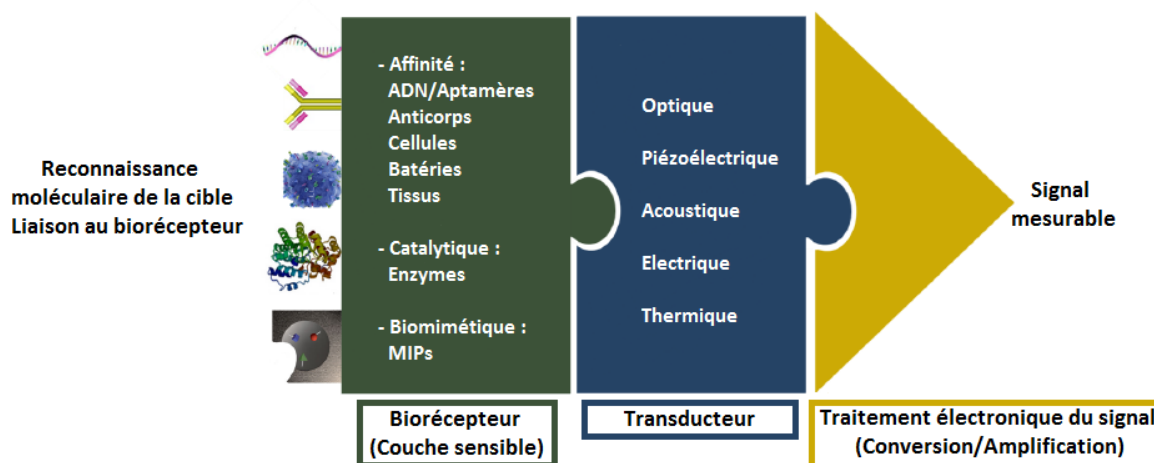


Figure 1.14 : Architecture d'un biocapteur (d'après [55]).

Les étapes clés de la mise au point d'un biocapteur sont le choix du biorécepteur, dont dépendra la sélectivité et la sensibilité du biocapteur et le choix du transducteur qui conditionne le mode de détection. Ces choix doivent découler de la nature et des propriétés intrinsèques de l'analyte cible et des futures conditions d'utilisation du biocapteur. Dans le paragraphe suivant, nous analyserons les différents types de biorécepteurs.

1.4.2 Types de biorécepteurs

Les trois grands types de biorécepteurs sont les récepteurs d'affinité (ADN/aptamères, anticorps, cellules, bactéries, tissus), les récepteurs catalytiques (enzymes) et les récepteurs biomimétiques (polymères à empreintes moléculaires).

1.4.2.1 Récepteur d'affinité

Les biorécepteurs de ce type sont capables de former des liaisons hautement spécifiques et stables. Parmi les récepteurs d'affinité, les immunorécepteurs, basés sur le principe de reconnaissance anticorps/antigène sont les plus utilisés dans le domaine des biocapteurs. Les anticorps sont des glycoprotéines produites par le système immunitaire pour lier spécifiquement les toxines qui attaquent l'organisme vivant (poison, virus, bactéries) et que l'on appelle les antigènes. Les anticorps sont formés de deux chaînes polypeptidiques lourdes et de deux chaînes polypeptidiques légères reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures qui assurent la flexibilité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y et sont constituées de domaines immunoglobulines d'environ 110 acides aminés. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable. Les chaînes lourdes sont composées d'un fragment variable et de trois ou quatre fragments constants selon l'isotype. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères. La partie de reconnaissance se trouve au niveau des chaînes légères (Fab). Le fragment cristallisable qui constitue la région de la queue de l'anticorps interagit avec les récepteurs en surface des cellules. Ce fragment ne combine pas avec l'antigène mais la présence de groupes carboxyles en terminaison des acides aminés permettent la fixation des anticorps à des substrats solides comme les transducteurs (voir figure 1.15).

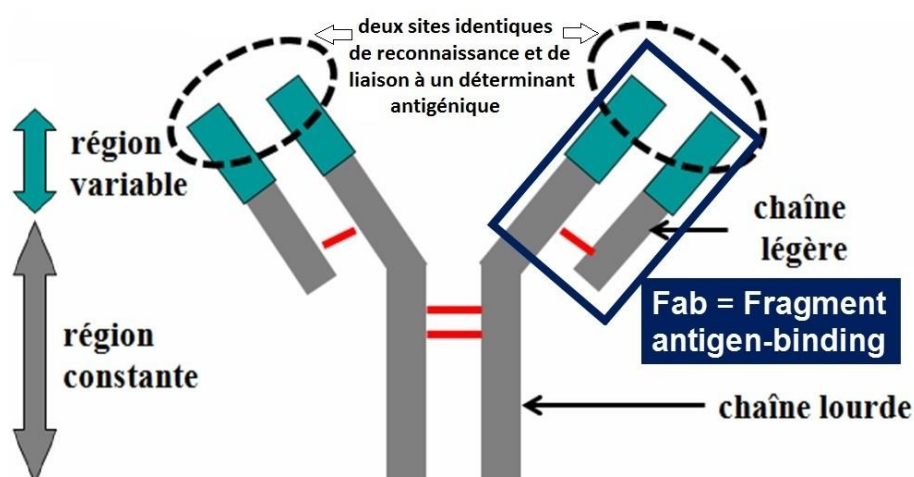


Figure 1.15 : Représentation schématique d'un anticorps [52].

La mise au point d'anticorps dirigés contre une molécule cible est un long processus qui demande beaucoup de travail. Ceci est d'autant plus vrai pour des molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 400 Da, ce qui est le cas de la sphingosine 1-phosphate. De plus, la liaison formée est irréversible. De ce fait, les sites de réception peuvent être saturés et leur libération nécessitera une acidification du milieu qui aura aussi pour conséquence d'altérer définitivement l'affinité et la spécificité du récepteur. Les biocapteurs employant des anticorps ne pourront donc être utilisés qu'une seule fois.

Dans le cas des récepteurs à ADN ou à aptamères, la reconnaissance est basée sur la formation d'une liaison hydrogène stable entre deux brins d'acide nucléique. La spécificité des sondes à acides nucléiques repose sur la capacité de différents nucléotides à former des liaisons seulement avec un partenaire approprié. L'avantage des ligands d'acide nucléiques est qu'ils peuvent être dénaturés en contrôlant la concentration en ion du solvant pour rompre la liaison et régénérer les sondes.

Les aptamères sont des séquences spécifiques d'acides oligonucléiques qui sont capables de se lier avec une grande affinité et une grande spécificité à des molécules cibles telles que les protéines. Ce sont des molécules d'ARN et d'ADN (entre 30 et 100 nucléotides) qui sont sélectionnées *in vitro*, pour une molécule cible donnée, par le procédé SELEX à partir d'un grand nombre de séquences prises au hasard. Leur avantages sont qu'ils sont plus stables, régénérables et relativement faciles à produire, une fois la séquence définie.

Lorsque des cellules sont utilisées en tant que bioélément, il s'agit majoritairement de bactéries, d'algues et de levures. Ce type de récepteur est plus robuste que ses composants pris isolément (enzymes, anticorps, ADN) et s'adapte plus facilement à des modifications de l'environnement (pH et température). La réponse enregistrée peut provenir d'une modification du métabolisme cellulaire, d'altérations membranaires ou encore d'un changement de l'expression de certains gènes [54], [56].

1.4.2.2 Récepteurs catalytiques

Les récepteurs catalytiques sont basés sur l'utilisation d'enzymes. Une enzyme est une protéine ayant la capacité de catalyser des réactions spécifiques. Elle est constituée d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques repliées pour former une structure tridimensionnelle correspondant à leur état natif. La séquence en acides aminés de l'enzyme détermine la structure de cette dernière, structure qui, à son tour, détermine les propriétés catalytiques de l'enzyme. Elles sont classées en famille selon le type de réactions catalysée. Les enzymes les plus utilisées dans les biocapteurs sont les oxydases, les réductases et les hydrolases. Elles peuvent être utilisées en tant qu'élément biologique d'un biocapteur pour leur capacité de liaison spécifique ou pour leur rôle dans la transformation catalytique d'espèces en formes détectables. L'une des difficultés majeures de l'utilisation de ce type de récepteur est de parvenir à une bonne qualité de contact entre l'enzyme et le transducteur. Ce paramètre fondamental dépend de l'étape d'immobilisation des enzymes sur le transducteur [54], [56].

1.4.2.3 Récepteurs biomimétiques : les polymères à empreintes moléculaires

Le développement des biocapteurs rencontre des limitations qui sont majoritairement liés aux récepteurs biologiques et à leurs propriétés physiques et chimiques, en tout premier lieux à leur faible stabilité. En effet, tous les éléments présentés précédemment, du fait même de leur nature biologique, tolèrent mal les effets de l'environnement comme des changements de température, de pH, l'exposition à des solvants organiques ou à l'eau ce qui peut les rendre totalement inefficaces et inutilisables. Ainsi, ils devront être utilisés dans des conditions bien particulières et limitées. Leur stockage pour les maintenir dans de bonnes conditions est contraignant et leur conservation dans le temps réduite. De plus, la disponibilité faible et le coût élevé de certains biorécepteurs (anticorps, enzymes) sont souvent présentés comme des freins importants à leur utilisation pour la conception d'un biocapteur. Enfin, des difficultés d'intégration adéquate des molécules biologiques sur les biocapteurs nécessitant la mise au point d'une méthode d'immobilisation ont été rapportées [54].

Toutes ces limitations ont conduit au développement des polymères à empreintes moléculaires (MIP), un matériau biomimétique synthétique, robuste, renouvelable, de faible coût et capable d'imiter les propriétés d'identification et de liaison des matériaux de reconnaissance naturel. En plus de leur grande stabilité face à l'environnement (pH, température, solvant et milieu aqueux), les MIP sont structurables et il sera plus aisé de les coupler à un transducteur. Enfin, les MIP sont parfaitement adaptés à la détection de molécules de faible poids moléculaire comme la S1P [57], [58]. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'utiliser un MIP en tant que couche sensible pour le capteur que nous souhaitons développer. Les MIPs sont décrits de façon détaillée dans les paragraphes suivant.

1.5 Les polymères à empreintes moléculaires

1.5.1 Historique

C'est en 1931 alors qu'il travaille sur la mise au point de matrices de silice poreuses pour des applications de chromatographie, que M.V. Polyakov découvre l'effet d'impression, c'est-à-dire la formation d'une empreinte laissée par une molécule dite « *template* » (en l'occurrence du benzène, du toluène ou du xylène) dans un matériau synthétique (dans son cas, les particules de silice). Il décrit pour la première fois l'effet de reconnaissance moléculaire sélective de l'empreinte [59]. Quelques années plus tard, il étudie de plus près ce phénomène de reconnaissance moléculaire sélective et émet l'hypothèse que la sélectivité observée pourrait être due à des changements de structure de la matrice qui découlent de la nature chimique de la molécule utilisée [60], [61].

En 1949, F.H. Dickey polymérise des gels de silice en présence d'hélianthine, retire par la suite l'hélianthine du gel de silice pour libérer les empreintes créées puis expose de nouveau ces

gels aux différentes espèces. Il note une sélectivité du gel augmentée pour l'espèce en présence de laquelle il a été polymérisé et aussi par rapport à un gel de silice polymérisé sans la présence d'hélianthine [62]. Dans les années qui suivent, les gels de silice à empreintes moléculaires se développent et donnent lieu à de très nombreuses applications [63].

En 1972, les groupes de G. Wulff [64] et I.M. Klotz [65] démontrent de manière indépendante qu'il est possible de réaliser des empreintes moléculaires dans des polymères organiques. Plus précisément, alors que I.M. Klotz et son équipe synthétisent des polymères réticulés pour l'adsorption spécifique de l'hélianthine, G. Wulff et A. Sarhan obtiennent un polymère macroporeux qui résulte de la copolymérisation d'une molécule *template* (l'acide D-glycérique), préalablement fonctionnalisée avec des groupements polymérisables, avec un agent réticulant dans un solvant organique. L'acide D-glycérique extrait par clivage chimique laisse place à des cavités au sein du polymère qui sont caractérisées par un arrangement asymétrique des groupements fonctionnels se révélant complémentaires de la molécule extraite. Leur polymère est non seulement capable d'une reconnaissance sélective de l'acide D-glycérique, mais il peut aussi le différencier d'un énantiomère, l'acide L-glycérique. De plus, ils observent une perte d'affinité en cas de gonflement du polymère, mettant en évidence le rôle de la géométrie (forme et taille) des sites d'interactions dans le processus de reconnaissance moléculaire [64].

Une révolution majeure dans l'évolution des polymères à empreintes moléculaires a été l'introduction de l'approche dite « non-covalente » par l'équipe de K. Mosbach au début des années 80 [66]. Cette méthode consiste en la copolymérisation de monomères, dont les groupements fonctionnels sont susceptibles d'interagir avec la molécule cible via des interactions non-covalentes, et d'un agent réticulant dans un solvant. La polymérisation permet de figer au sein du polymère des sites d'interaction tridimensionnels complémentaires de la molécule imprimée. Après extraction de la molécule *template* avec des solvants, ces sites assurent la reconnaissance spécifique de la molécule cible, contrairement à un polymère identique mais non imprimé (NIP pour *Non Imprinted Polymer*).

Dans les années 90, suite à la publication de plusieurs articles démontrant la possibilité d'imprimer une grande diversité de molécules cibles par l'approche non-covalente [67]–[70] les recherches sur le sujet s'intensifient, en témoigne l'explosion du nombre de publications dans ce domaine. C'est au tout début de cette période (1993), que Vlatakis et al., [71] démontre qu'un polymère à empreintes moléculaires peut afficher une sélectivité comparable à celle des récepteurs biologiques.

Par la suite les MIPs ont surtout été employés en tant que phase solide dans les extractions pour des applications de séparation. Quelques entreprises proposent des MIPs commerciaux, c'est le cas de l'entreprise française PolyIntell [72] fondée en 2004, l'entreprise suédoise Biotage [73] ou encore de Sigma Aldrich [74]. Une autre application commerciale des MIPs plus récente se démarque par son domaine d'application, elle concerne la recherche d'explosif avec le lancement par l'entreprise américaine Wheatley SPI LLC d'un kit portable à base de MIP pour la détection rapide de résidus d'explosifs. Aujourd'hui les MIPs sont utilisés dans différents domaines tels que l'environnemental, l'agroalimentaire, la cosmétique et le

pharmaceutique pour de la détection chimique ou biologique au sein de matrices complexes, la délivrance de médicaments, les tests d'affinité et la mise au point de capteurs [75]–[77].

1.5.2 Principe général des MIPs

Les polymères à empreintes moléculaires sont des récepteurs biomimétiques artificiels (on les appelle parfois anticorps plastiques ou synthétiques) doté d'une capacité de reconnaissance et de liaison envers une molécule cible. Leur fonctionnement repose sur le principe de l'impression moléculaire. L'impression moléculaire est basée sur la co-polymérisation activée par un initiateur au sein d'un solvant porogène, de monomères fonctionnels et d'un agent réticulant en présence de la molécule cible (ou d'un analogue) qui joue alors le rôle de molécule *template*. La formation de complexes entre la molécule *template* et les monomères fonctionnels, qui ont été choisis pour interagir avec la molécule cible, crée des sites d'interaction qui se retrouvent figés dans la matière suite à la polymérisation avec l'agent réticulant. L'extraction successive de la molécule *template* piégée dans le polymère révèle alors la présence de cavités tridimensionnelles complémentaires en taille, en forme et en fonctionnalité chimique de la molécule cible. Ces cavités sont les « empreintes » que la molécule cible a laissée dans le polymère, d'où le nom de polymère à empreintes moléculaires (voir figure 1.16).

Ce sont ces empreintes qui confèrent au polymère sa faculté de reconnaître et d'interagir spécifiquement avec la molécule cible lorsqu'il y sera exposé [71], [78]. Le(s) monomère(s) fonctionnel(s), l'agent réticulant, le solvant porogène et la technique de polymérisation utilisée sont choisis et optimisés en fonction de la molécule cible, dans le but d'obtenir la meilleure sélectivité, la capacité d'absorption maximale et des propriétés physicochimiques adaptées à l'application envisagée.

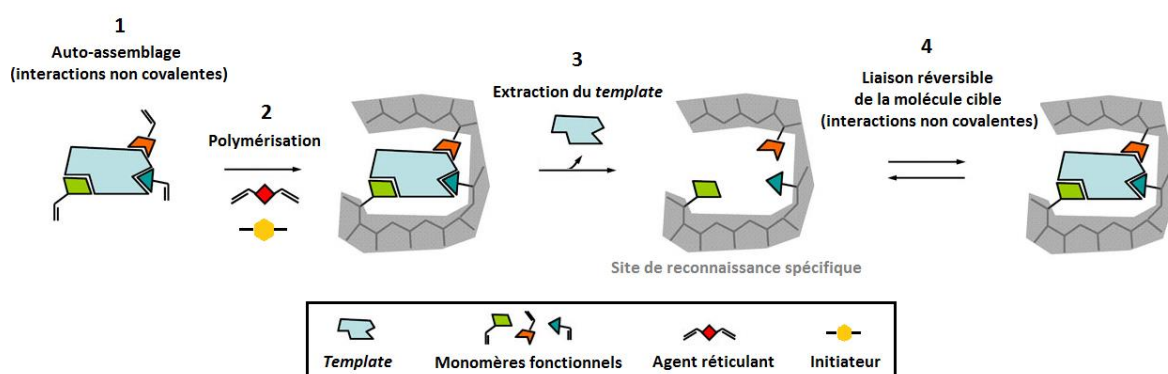


Figure 1.16 : Etapes de la préparation d'un MIP (d'après P. Manesiotis).

L'étape clé dans le processus d'impression moléculaire est la formation d'un complexe avant l'étape de polymérisation entre la molécule *template* et les monomères fonctionnels. Il existe trois stratégies distinctes qui se différencient par la nature des interactions qui conduisent à la formation de ce complexe. Il s'agit de l'approche non-covalente, de l'approche covalente et de l'approche semi-covalente.

1.5.2.1 L'approche non-covalente

L'approche non-covalente qui découle d'une vision biochimiste de la problématique a été introduite par Mosbach en 1981 comme nous l'avons vu précédemment [66]. Elle s'inspire du fait que la majorité des mécanismes biologiques naturels de reconnaissance reposent sur des interactions faibles non-covalentes. Dans cette méthode, les monomères fonctionnels s'auto-assemblent autour de la molécule *template* via des interactions faibles de type électrostatique, hydrogène, de van der Waals, ionique ou hydrophobe. Après polymérisation et extraction de la molécule *template*, le même type d'interactions faibles permettra la reconnaissance de la molécule cible au niveau des empreintes créées.

L'association des monomères fonctionnels avec la molécule *template* est gouvernée par un équilibre d'association/dissociation et les monomères fonctionnels doivent normalement être ajoutés en excès par rapport au nombre de moles de la molécule *template* (au moins quatre fois plus) afin de favoriser la formation du complexe. En conséquence, cet excès de monomère donne lieu à un nombre de configurations de complexe monomère fonctionnel-molécule *template* différent, ce qui conduit à une distribution hétérogène de sites de liaison avec des constantes d'affinité différentes.

Cela se traduit notamment par la présence aléatoire de sites non totalement imprimés caractérisés par une complémentarité partielle de la molécule *template* et responsable d'interactions non spécifiques (voir figure 1.17).

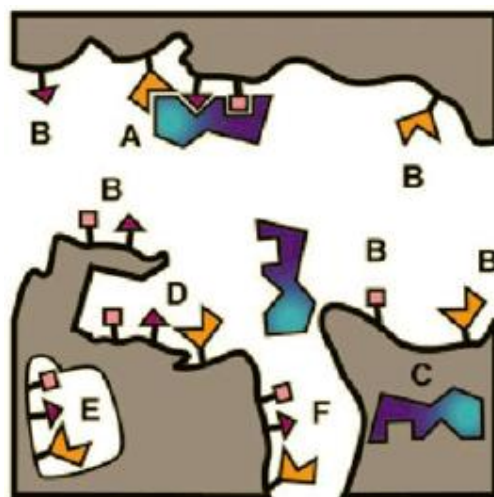


Figure 1.17 : Hétérogénéité de la distribution des sites de reconnaissance d'un MIP synthétisé par la méthode non-covalente. (A) sites de forte affinité au niveau de macropores et (F) de micropores, (B) sites de faible affinité au niveau de macropores, (C) template piégé dans la matrice polymérique, (E) sites inaccessibles et (D) sites de plus grande affinité avec complémentarité de forme [79]

A cause de la faiblesse des liaisons impliquées, l'efficacité d'impression, qui est définie comme le rapport entre le nombre de sites formés et le nombre de molécules *template* utilisées pour la synthèse, est relativement faible pour cette méthode. En effet, de la tension s'accumule dans la matrice polymérique au cours de la polymérisation avec l'agent *réticulant* et cette tension est continuellement relâchée lors de la dissociation du complexe molécule *template*-monomère fonctionnel, dissociation qui est directement liée à la faiblesse des liaisons. Ainsi, la relaxation de la chaîne polymérique conduit à la destruction de sites d'impression avant-même qu'ils puissent être figés par la polymérisation totale. Malgré tout, cette méthode reste la plus répandue (plus de 90 % des MIPs décrits dans la littérature) notamment du fait de sa simplicité de mise en œuvre (pas d'étape de fonctionnalisation de la molécule cible) et aussi du large choix de monomères fonctionnels commerciaux disponibles, ce qui augmente le nombre de molécules cibles imprimables et donc la gamme des domaines d'applications [79]. Un autre avantage de cette méthode est la relative simplicité d'extraction de la molécule *template* (en comparaison avec la méthode covalente) après polymérisation. En effet les interactions non-covalentes telles que les interactions hydrogène peuvent être « cassées » par un lavage avec des solutions de différents pH [80].

1.5.2.2 L'approche covalente

L'approche covalente, fruit d'une vision plutôt « chimique » a été développée par G. Wulff [64] et K. J. Shea [81] dans les années 70. Cette approche est basée sur la formation d'un complexe de pré-polymérisation entre la molécule *template* et les monomères fonctionnels par le biais de liaisons covalentes réversibles. La méthode demande donc de réaliser avant

toute polymérisation, une synthèse chimique assez évoluée dont le but est de greffer de manière covalente la molécule *template* sur un monomère polymérisable. Suite à la copolymérisation (activé par un initiateur) du complexe ainsi formé en présence d'un agent réticulant dans un solvant porogène, la molécule *template* est extraite par clivage chimique, révélant des cavités qui exposent les groupements fonctionnels qui permettront la reconnaissance de la molécule cible via des interactions covalentes.

L'ajout de la molécule *template* et de monomères fonctionnels en quantité stœchiométrique permet d'obtenir une bonne homogénéité des sites de reconnaissance, ce qui limite le nombre de sites de faible affinité responsables d'interactions non spécifiques. De plus, une meilleure stabilité du complexe de pré-polymérisation est rendu possible grâce aux liaisons covalentes fortes et il en résulte une meilleure efficacité d'impression en comparaison à la méthode non-covalente.

Cependant, cette approche est moins simple à mettre en œuvre et requiert des compétences en chimie pour la formation du complexe de pré-polymérisation. D'autre part, le nombre de molécules possiblement « imprimables » par cette technique est plus faible puisque qu'il n'est pas toujours possible de modifier chimiquement toutes les molécules. Enfin, comme les liaisons covalentes demandent un temps plus long pour s'établir, les cinétiques d'interaction sont globalement plus faibles que dans le cas de la méthode non-covalente [82].

1.5.2.3 L'approche semi-covalente :

Afin de bénéficier des avantages des deux techniques précédentes (bonne homogénéité des sites de reconnaissance et bon rendement d'impression pour la méthode covalente vs cinétique d'interaction rapide entre la molécule cible et les sites d'interaction pour la méthode non-covalente) Whitecombe *et al.*, [83] ont développé en 1995 une nouvelle stratégie d'impression alternative appelée «semi-covalente». Comme dans la méthode covalente, la formation préalable d'un complexe de pré-polymérisation entre la molécule *template* et les monomères fonctionnels avant la polymérisation se fait par des interactions covalentes mais par contre, la future reconnaissance moléculaire avec la molécule cible se fait via des interactions non-covalentes. Cette technique reste néanmoins peu utilisée dans la communauté des MIPs.

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de nous concentrer sur l'approche non-covalente.

1.5.3 Rôle des différents constituants

La première étape de la synthèse d'un MIP par la méthode non-covalente est la mise au point de la formulation dont la réussite dépend du choix des principaux réactifs qui sont la molécule *template*, les monomères fonctionnels, l'agent réticulant, l'initiateur de polymérisation et le solvant de mélange. Le choix de la molécule *template* dépend évidemment de la molécule

cible et généralement, il sera la molécule cible elle-même. Il doit aussi être inerte chimiquement dans les conditions de la polymérisation (température, irradiation UV, pH) [80]. Cependant, il faut quand même préciser que pour certaines raisons (prix élevé, rareté voire indisponibilité, difficultés de manipulation, toxicité, dangerosité, stabilité) la molécule cible peut être remplacée par une molécule analogue (au niveau structurel et chimique) lors de la synthèse. On parle alors de molécule «*dummy template*». Les choix des autres réactifs et du solvant de polymérisation sont en grande partie dictés par les propriétés de la molécule *template* (surtout le choix des monomères fonctionnels qui devront être capables de former un complexe avec la molécule *template*) et doivent permettre la solubilisation de tous les réactifs entre eux. L'application visée du MIP peut également intervenir dans le choix des différents constituants.

1.5.3.1 Les monomères fonctionnels

Comme on l'a vu précédemment, la méthode non-covalente débute par la formation d'un complexe entre la molécule *template* et les monomères fonctionnels qui s'auto-assemblent par des interactions non-covalentes faibles (électrostatiques, hydrogènes, van der Waals, ioniques, hydrophobes). La quantité et la qualité des sites de reconnaissance dépendent directement des mécanismes qui sous-tendent la formation de ce complexe et aussi du degré de complexion. Les monomères fonctionnels doivent donc être choisis en fonction de leur complémentarité avec les groupements chimiques de la molécule *template* dans le but d'obtenir des empreintes avec les meilleures propriétés de reconnaissance possibles [79].

Les propriétés de l'environnement dans lequel aura lieu la formation du complexe (pH, température) et le temps de réaction, influent directement sur l'équilibre association/dissociation, sur la stabilité et la solubilité du complexe et sont donc des paramètres très importants à prendre en compte si l'on veut maximiser l'efficacité de l'effet d'empreinte [84], [85].

Un seul type de monomère fonctionnel peut être utilisé lors de la synthèse d'un MIP ou il peut s'agir de la combinaison de plusieurs types de monomères fonctionnels pour cibler différents groupes chimiques réactifs de la molécule cible et augmenter la sélectivité. Cependant, un trop grand nombre de types différents de monomères fonctionnels serait contre-productif et réduirait la sélectivité [76]. La concentration de monomère fonctionnel est un paramètre important à contrôler. Un excès de monomères fonctionnels par rapport à la molécule *template* est souvent de mise afin d'augmenter les chances de formation du complexe. En général, un monomère fonctionnel possède deux groupes fonctionnels. D'un côté il peut former les liaisons non-covalentes avec la molécule *template* et de l'autre côté il peut interagir de façon covalente avec l'agent *réticulant* (voir définition ci-après) ou d'autres monomères [80]. Les monomères fonctionnels typiquement utilisés (voir figure 1.18) sont des acides carboxyliques (acide acrylique, acide méthacrylique, acide vinylbenzoïque), des acides sulfoniques (acide sulfonique 2-acrylamido-2-méthylpropane) et des espèces

Chapitre 1 : Contexte et objectifs de la thèse

hétéroaromatiques (vinylpyridine, vinylimidazole) [86]. Des monomères non commerciaux peuvent aussi être synthétisés sur mesure dans les laboratoires de recherche.

Pour accélérer l'optimisation du choix des monomères fonctionnels, des méthodes de synthèse combinatoire associées à un criblage haut-débit et à la modélisation moléculaire peuvent être utilisées. Ces méthodes permettent de tester *in silico* la plus ou moins grande capacité de monomères fonctionnels archivés dans une banque de données numérique, à former un complexe avec la molécule *template* choisie [79], [87]. Cela permet de réaliser un premier tri important parmi tous les monomères fonctionnels disponibles, voire parfois de sélectionner le ou les monomères fonctionnels définitifs, qui devront par la suite être testés de manière expérimentale.

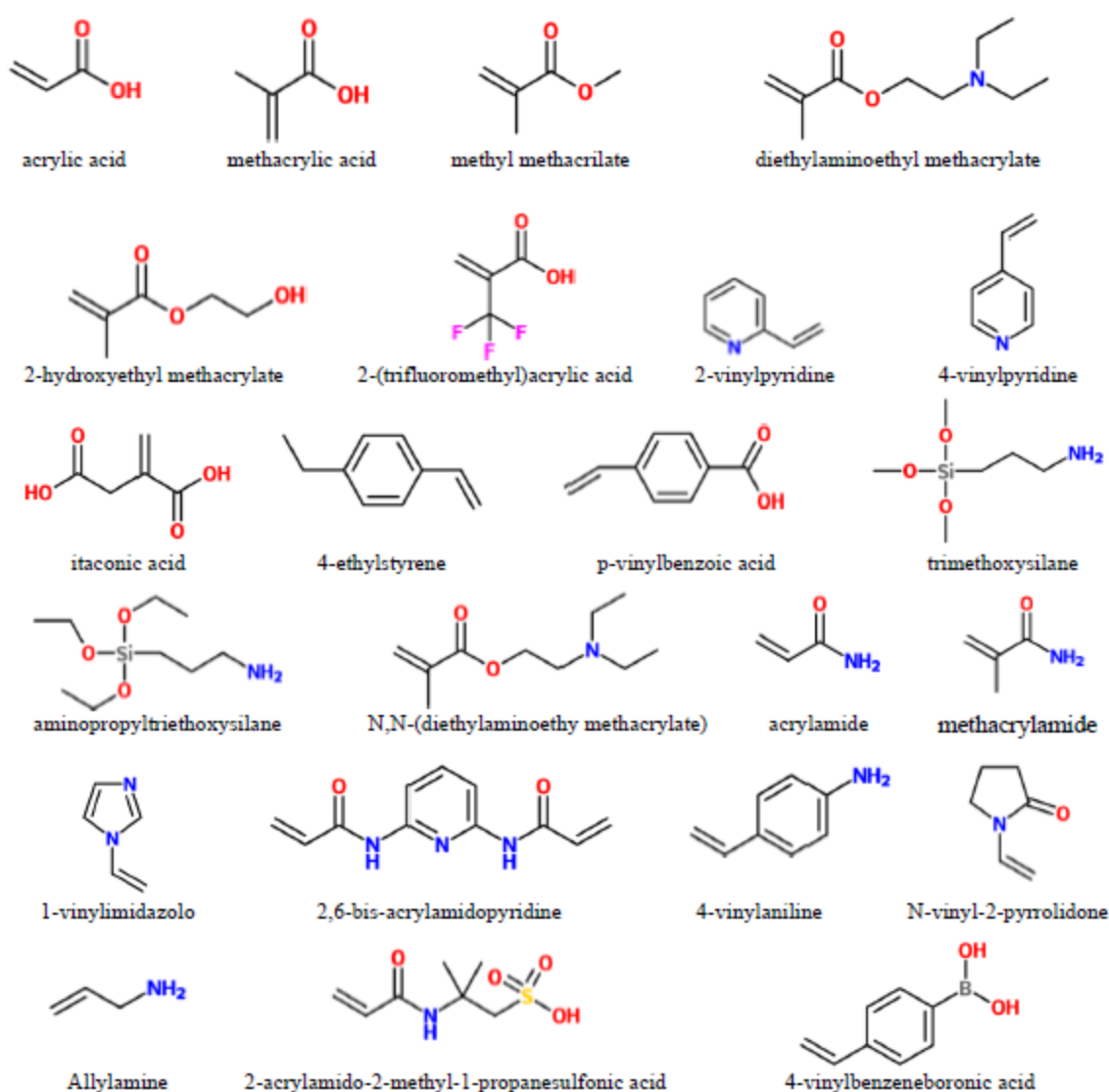


Figure 1.18 : Différents types de monomères fonctionnels [80].

1.5.3.2 L'agent réticulant

Dans le processus de polymérisation, l'agent réticulant est utilisé pour figer le complexe molécule *template*/monomères fonctionnels dans une matrice polymérique rigide à fort degré de réticulation. Il assure la stabilité mécanique des empreintes obtenues après extraction de la molécule *template* et donc le maintien de la propriété de reconnaissance moléculaire. Le ratio entre la quantité d'agent réticulant par rapport à la quantité de monomères fonctionnels et la quantité de molécule *template* doit être contrôlé finement puisque les propriétés mécaniques du polymère final en dépendent. Ainsi, une quantité trop faible d'agent réticulant conduira à un polymère mécaniquement instable (trop mou) et les empreintes ne seront pas maintenues. Au contraire une trop grande quantité d'agent réticulant conduira à un polymère trop rigide et à une efficacité d'impression plus faible (moins de sites par unité de masse). Un polymère trop rigide aura un effet détrimental vis-à-vis de la diffusion de la molécule cible dans la matrice ce qui conduira à une mauvaise accessibilité de la molécule cible jusqu'aux empreintes. Le type et la quantité d'agent réticulant ont donc une incidence directe sur la capacité de liaison et la sélectivité du MIP [76]. De plus, s'il est sous forme liquide, l'ajout de l'agent réticulant peut aider à la solubilisation du mélange de pré-polymérisation, même si ce n'est pas là sa fonction première.

Un des agents réticulant le plus employé est l'éthylène glycol diméthacrylate (EDMA) qui contient deux groupements vinyles polymérisables (voir figure 1.19).

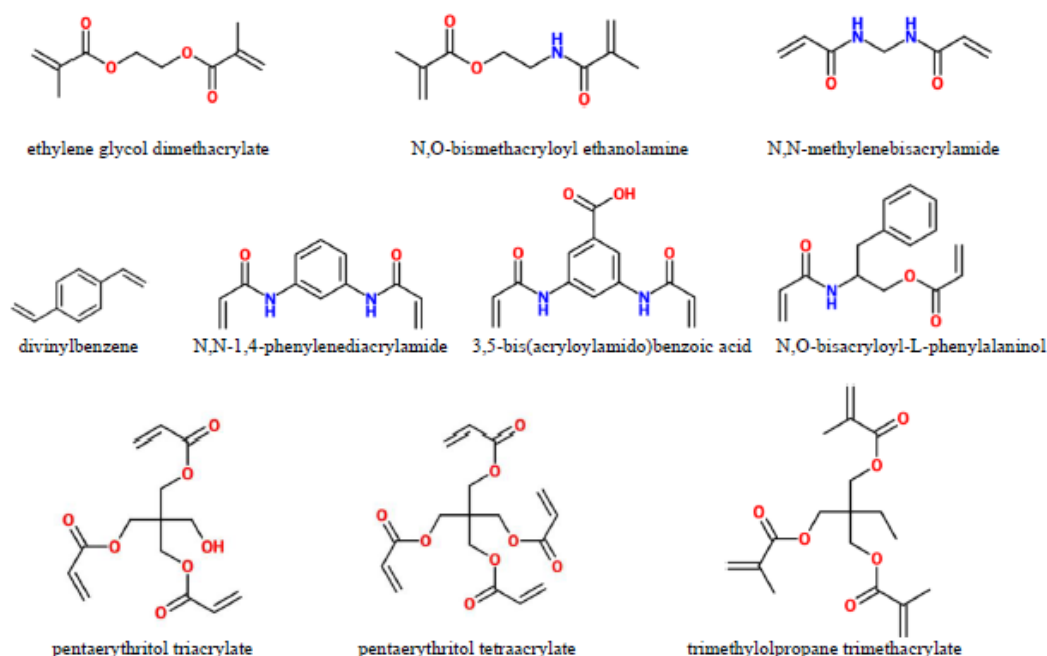


Figure 1.19 : Différents types d'agents réticulants [80].

1.5.3.4 L'initiateur de polymérisation

L'initiateur permet de débiter la réaction de polymérisation en se décomposant en radicaux libres. Il est ajouté en faible quantité dans le mélange de pré-polymérisation (autour de 1% du nombre total de moles de doubles liaisons polymérisables). En fonction de sa nature chimique, sa décomposition en radicaux libres peut se faire par exposition à de l'énergie thermique ou par exposition aux rayons ultraviolets (parfois les deux méthodes pour le même initiateur sont possibles). Le choix de l'initiateur dépendra de l'application souhaitée et des conditions expérimentales qui lui sont associées. Pour permettre la réaction de polymérisation, le retrait de l'oxygène dissous dans la solution de pré-polymérisation est obligatoire. Cette action peut être réalisée en faisant buller la solution avec un gaz inerte comme l'azote ou l'argon [76]. Des exemples d'initiateurs sont présentés dans la figure 1.20.

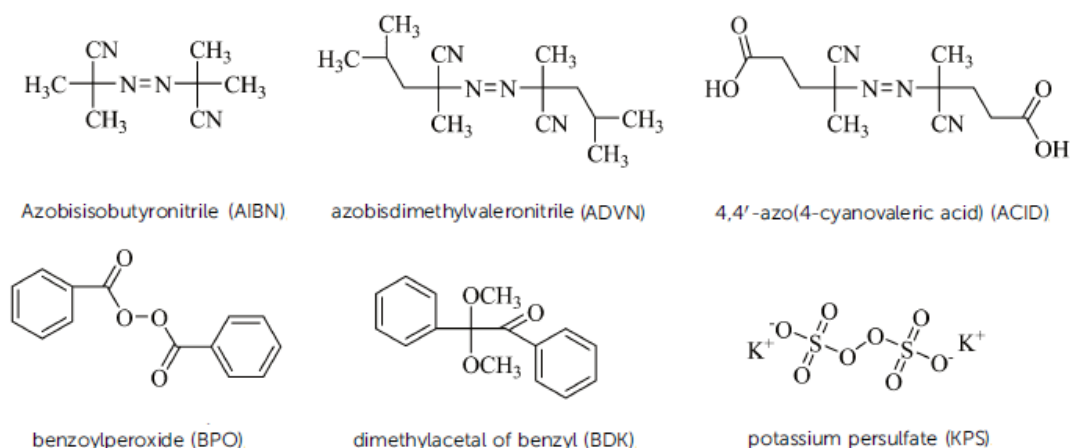


Figure 1.20 : Différents types d'initiateurs [76].

1.5.3.5 Le solvant

La première fonction du solvant est de solubiliser tous les réactifs que contient la solution de pré-polymérisation. Il est aussi à l'origine de la formation d'une porosité dans le polymère (on parle de solvant porogène) qui est nécessaire à l'extraction de la molécule *template* et à l'accès de la molécule cible jusqu'aux empreintes. La nature et la quantité de solvant déterminent aussi la force des interactions non-covalentes et influencent la morphologie du polymère qui affecte directement les performances de reconnaissance. La nature des interactions non-covalentes mises en jeu impose un choix judicieux du solvant. Par exemple, le solvant ne doit pas rentrer en compétition avec la molécule *template* pour sa liaison au monomère. Lorsque les interactions sont de type hydrogènes, les synthèses sont souvent réalisées dans des solvants aprotiques (qui ne formeront pas de liaisons hydrogènes avec les monomères fonctionnels) et apolaires (qui stabiliseront les liaisons hydrogènes molécule *template*/monomères fonctionnels). On peut donner l'exemple du toluène, du dichlorométhane et du chloroforme.

Cependant, des solvants peu polaires (acétonitrile, diméthylsulfoxyde, diméthylformamide) sont souvent employés pour améliorer la solubilité des réactifs.

Les solvants protiques et polaires (eau, alcools) sont théoriquement exclus et réaliser un MIP compatible avec un milieu aqueux est un des défis de la recherche sur les MIP. Il existe néanmoins des exemples de MIP utilisés dans l'eau mais les interactions sont plutôt de type hydrophobe.

Le choix du solvant peut également être dicté par l'application. Par exemple, pour la préparation de MIP sous forme de films minces par la méthode de *spin-coating* un solvant faiblement volatil sera nécessaire pour limiter le phénomène d'évaporation lors du dépôt qui conduirait à l'absence de porosité au sein du polymère.

Enfin, il est important de rappeler que l'incubation de la molécule cible est généralement réalisée dans le même solvant que celui utilisé lors de la synthèse afin d'optimiser les performances d'interaction. Des conditions de solvation identiques garantiraient une géométrie et une accessibilité optimale [79], [88], [89].

1.5.4 Types de polymérisation

Parmi tous les types de polymérisation, la polymérisation radicalaire libre est la plus accessible, la plus simple et la plus flexible à mettre en œuvre d'un point de vue de la pureté des réactifs, des conditions expérimentales et du choix des monomères. C'est une approche très attractive qui est compatible avec un large choix de monomères portant différents groupes fonctionnels et tolérant la présence de molécules supplémentaires comme la molécule *template*. C'est ce qui en fait le type de polymérisation le plus utilisé dans la communauté des MIP et que l'on retrouve dans la majorité des publications. La polymérisation radicalaire libre est une réaction en chaîne qui s'opère en trois étapes (voir figure 1.21) : l'initiation (ou amorçage), la propagation et la terminaison.

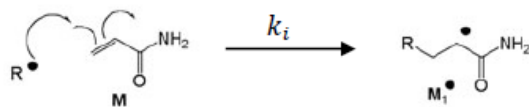
-L'amorçage : la polymérisation est initiée par la génération de radicaux libres ($R\bullet$) en solution suite à la décomposition d'un initiateur sous l'effet d'une augmentation de l'énergie thermique, d'un rayonnement UV, ou d'une réaction chimique. Le radical attaque la double liaison polymérisable d'un monomère (M), générant un radical intermédiaire ($M1\bullet$). L'étape d'amorçage est l'étape limitante de la réaction de polymérisation.

-La propagation : la chaîne polymérique se forme par ajouts successifs de monomères au niveau du macroradical en croissance ($M_n\bullet$), avec propagation du site réactif. Le résultat de cette étape est un mélange de chaînes polymériques avec un fort poids moléculaire.

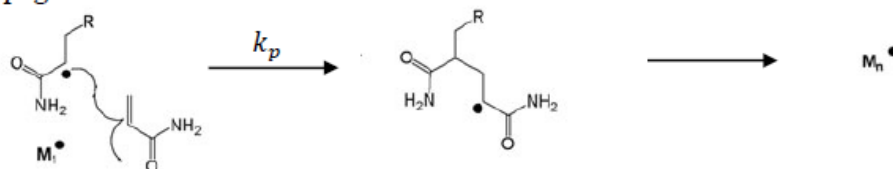
-La terminaison : c'est l'étape de désactivation du site actif qui entraîne l'arrêt de la croissance de la chaîne polymérique. La terminaison peut avoir lieu suite à deux mécanismes principaux : la recombinaison de deux macroradicaux entre eux ($M_n\bullet$ et $M_p\bullet$) pour former une

macrochaîne (M_{n+p}) ou la dismutation qui conduit à une double liaison $M_n=$ et à une liaison C-H à la terminaison de la chaîne M_pH .

Amorçage



Propagation



Terminaison

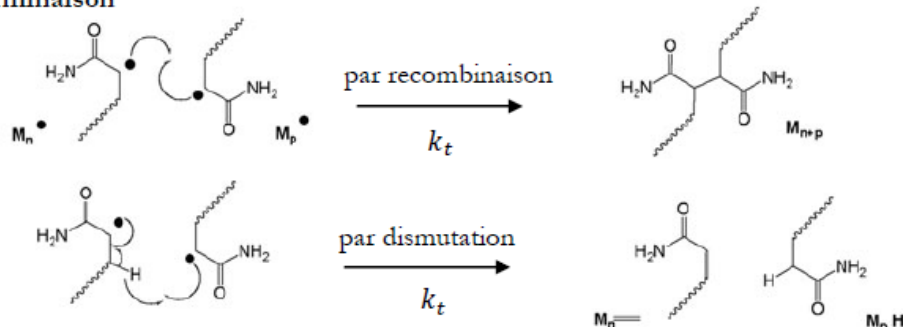


Figure 1.21 : Etapes la polymérisation radicalaire libre [79].

Cependant, au cours de la polymérisation radicalaire libre, des réactions parallèles avec des impuretés (oxygène, inhibiteurs) ou des réactions de transfert de chaîne (transfert de l'activité de la chaîne en croissance à des molécules du solvant, au polymère ou à la molécule *template*) peuvent arrêter la croissance polymérique et conduire à des chaînes polymériques plus courtes. Ces réactions avec terminaisons aléatoires et irréversibles empêchent le contrôle de la longueur et de l'architecture des chaînes polymériques. Le poids moléculaire du polymère final ne peut pas être contrôlé ni même prédit et l'obtention d'une distribution homogène des sites de reconnaissance accessibles est rendu impossible. Pour contourner ces limitations, l'utilisation de techniques de polymérisation contrôlée (contrôle de la croissance et de la terminaison) est une solution [90].

Il s'agit des polymérisations « contrôlées/vivantes radicalaires ». Pour résumer, les mécanismes de ce type de polymérisation sont proches de ceux de la polymérisation radicalaire libre, sauf que le radical propagateur est rapidement piégé par un radical persistant pour former une espèce réactive dormante. Cette réaction est réversible, l'espèce dormante peut de nouveau se décomposer en un radical persistant et un radical propagateur (d'où l'appellation de « vivante »). Le radical propagateur s'ajoute sur quelques unités monomériques avant de retourner à l'état dormant. Un équilibre s'établit ainsi entre les espèces actives et les espèces dormantes. Ces méthodes permettent d'obtenir des films

minces d'architecture et de morphologie contrôlées permettant d'obtenir une grande homogénéité et une meilleure accessibilité des sites de reconnaissance [79]. On peut citer à titre d'exemple la méthode de transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) [91] et la polymérisation iniferter (de l'anglais *initiator-transfer agent-terminator*) [92].

1.5.5 Méthodes de préparation et formes physiques des MIPs

Les MIP obtenus par polymérisation radicalaire libre sont traditionnellement et majoritairement préparés sous forme de monolithes par la méthode de « polymérisation en masse » (avec une faible quantité de solvant). Le polymère monolithique qui en résulte doit être broyé et tamisé pour obtenir des particules suffisamment petites (entre 5 et 50 μm) contenant une fraction raisonnable de sites de reconnaissance accessibles. Même si elle a été pendant longtemps la seule méthode possible et qu'elle reste encore la plus employée aujourd'hui, la polymérisation en masse n'est pas bien adaptée à la production d'une grande quantité de MIP et présente certaines limitations. L'étape de broyage est consommatrice en temps et conduit généralement à une perte importante de polymère. Les particules qui en résultent sont irrégulières et ont une large distribution en taille et en forme qui les rendent souvent inutilisables pour certaines applications [93]. De plus, cette méthode demande une grande quantité de molécule *template* ce qui peut représenter un problème lorsqu'elle est chère et rare. Enfin, selon les études théoriques, leur capacité de reconnaissance et de liaison sont faibles. A partir du milieu des années 90, afin de dépasser ces limitations, des méthodes de polymérisation ont vu le jour et ont donné différentes mises en forme des MIPs comme par exemple des particules de différentes tailles (polymérisation en suspension [94], émulsion [95], dispersion/précipitation [96], polymérisation à la surface de billes en verre [97]), des films, des membranes ou des couches (polymérisation *in situ* à la surface, par à l'intérieur d'une colonne de chromatographie ou sur une fibre optique [98]). Des exemples de différentes mises en forme sont présentés dans la figure 1.22).

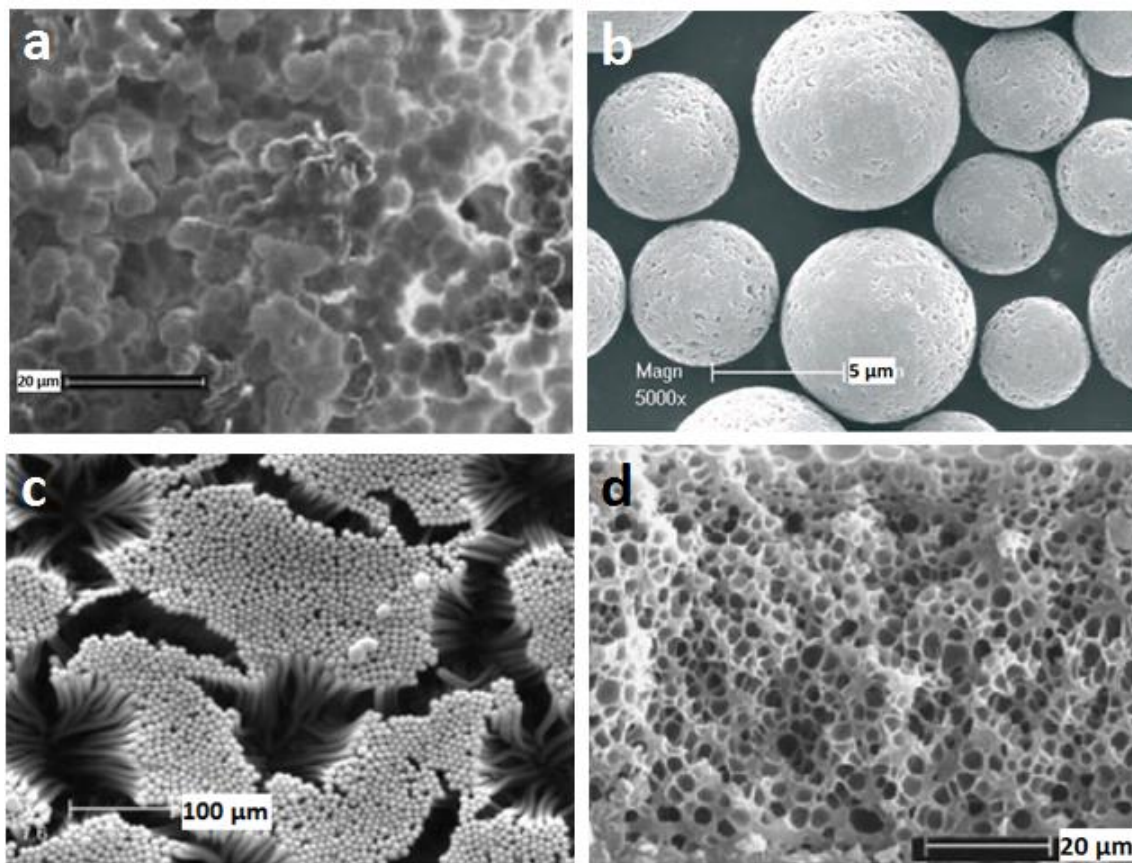


Figure 1.22 : Différentes mises en forme des MIPs. a) format « bulk », b) microbilles, c) microfilaments, d) membrane poreuse (d'après [93], [99]).

Ces méthodes assurent de meilleurs rendements de synthèse et une plus grande homogénéité et reproductibilité des sites de reconnaissance. L'accessibilité des sites est améliorée du fait de l'augmentation du rapport surface sur volume. Les MIP préparés par ces méthodes ont des capacités de reconnaissance améliorées et des cinétiques d'interaction plus rapides.

Le choix de la forme physique d'un MIP est avant tout dicté par son application future [55], [76], [88]. Dans l'optique de l'utilisation d'un MIP en tant que couche sensible d'un biocapteur, de nombreuses méthodes de polymérisation *ex situ* (MIP synthétisé sous forme de particules puis déposé sur la surface du transducteur) et de polymérisation *in situ* (MIP directement synthétisé en surface transducteur) ont été développés. On peut citer des exemples de techniques de structuration du MIP à l'échelle micro ou nanométrique telle que la déposition électrique, la déposition par aiguille, et la structuration optique comme la photolithographie [82]. Dans ce travail de thèse, les méthodes de polymérisation en masse et de polymérisation *in situ* à la surface de substrats solides ont été utilisées.

1.5.6 Avantages des MIPs

Comparés aux biorécepteurs naturels, les MIPs sont des récepteurs biomimétiques synthétiques qui ont une grande stabilité et qui sont très robustes vis-à-vis des conditions de température, de pression, de contraintes mécaniques, de solvants et de traitements chimiques [57]. Ils peuvent être préparés sur-mesure pour un coût peu élevé et pour une large gamme de molécules (même celles qui n'ont pas de récepteurs naturels associés). Une fois préparés, ils peuvent être stockés pendant des années dans des conditions ambiantes et ils sont théoriquement réutilisables à souhait [86]. En termes d'efficacité, la spécificité et l'affinité de leur reconnaissance moléculaire sont comparables à celles des récepteurs biologiques naturels sous certaines conditions [71].

1.6 Objectifs spécifiques

Comme annoncé précédemment nous avons décidé d'utiliser un MIP en tant que couche sensible pour le développement de notre capteur.

L'objectif du travail de thèse est donc de synthétiser un nouveau MIP capable de reconnaître la forme libre de la S1P et pouvant être couplé avec le transducteur d'un capteur de façon à permettre sa quantification sélective dans le plasma sanguin. Cela comprend la mise au point d'une nouvelle formulation de MIP et le développement de la méthode de polymérisation associée. Le test des propriétés de reconnaissance et de liaison du MIP pour la S1P ainsi que l'évaluation de sa sélectivité sont également nécessaires afin de le valider. Une dernière étape importante est de mettre en place une méthode de structuration du MIP permettant son immobilisation sur le transducteur d'un capteur.

Pour répondre à ces objectifs spécifiques, dans le chapitre 2, nous avons préparé un nouveau MIP pour la S1P par une méthode de thermopolymérisation en masse que nous avons caractérisé et optimisé grâce à des mesures de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide et des mesures de spectroscopie de fluorescence. Nous avons aussi évalué la sélectivité du MIP en l'exposant à des analogues structuraux de la S1P, puis travailler à son optimisation. Dans le chapitre 3, nous avons imaginé à quel type de capteur pouvait être associé notre MIP et nous avons développé une technique de photopolymérisation du MIP en 2D afin d'anticiper sa future immobilisation à la surface du transducteur de ce capteur. Nous avons d'abord structuré le MIP en motifs par photolithographie sur des surfaces de silicium avant de le valider par des mesures de microscopie de fluorescence. Dans un second temps nous l'avons structuré sous la forme de couches minces sur les surfaces actives de capteurs de Microbalance à Cristal de Quartz (QCM) dans le but de pouvoir le valider par cette méthode de détection sans marquage. En parallèle, nous avons commencé à réunir le matériel nécessaire à la mise en place du dispositif expérimental du capteur et à étudier les conditions pratiques de son utilisation.

Chapitre 2 : Synthèse par thermopolymérisation d'un MIP pour la S1P

2.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les propriétés de reconnaissance moléculaire des polymères à empreintes moléculaires, associées à leur stabilité, leur robustesse et leur facilité de mise en œuvre en font des matériaux extrêmement attractifs en tant que couche sensible pour le développement de capteurs [57], [100]. Ils constituent une alternative sérieuse à l'utilisation des éléments de reconnaissance biologiques et sont particulièrement bien adaptés à la détection de molécules de faibles poids moléculaire au sein des fluides biologiques [57], [101]. La majorité des polymères à empreintes moléculaires sont préparés par polymérisation radicalaire libre en suivant l'approche non covalente et une technique de polymérisation en masse [79], [93]. La synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires et notamment le choix du monomère fonctionnel et du solvant de polymérisation dépendent fortement des propriétés physico-chimiques de la molécule cible [79], [80]. Alors que de nombreux polymères à empreintes ont été synthétisés pour une grande variété de molécules biologiques [76], peu d'exemples de MIPs visant des phospholipides ont été rapportés dans la littérature. Cela pourrait être dû à la nature amphiphile de ces molécules qui rend difficile leur solubilisation et le choix du monomère fonctionnel, le défi étant de parvenir à complexer une molécule contenant un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe. De plus, la problématique à la base du développement d'un capteur impose souvent à l'élément de reconnaissance d'être sélectif d'une espèce, or les variations structurales entre les différentes molécules d'une même famille de phospholipides sont généralement faibles, ce qui rend difficile la préparation d'un MIP suffisamment sélectif pour l'application envisagée. Enfin, même si l'on rencontre de plus en plus d'exemple de MIPs performants dans des milieux aqueux, leur utilisation dans des fluides biologiques complexes reste encore aujourd'hui un défi de taille [102], [103].

En 2008, Pegoraro *et al.*, [104] ont focalisé leur travail sur la possibilité d'adopter un MIP sous forme de membranes polymériques imprimées avec de la phosphatidylcholine (PC) pour l'étude l'athérosclérose, une maladie liée au dépôt de lipides sur la paroi des artères (voir figure 2.1 A). Trois matrices polymériques différentes basées sur la copolymérisation entre l'éthylène et l'alcool vinylique ont été préparées par la technique d'inversion de phase et avec trois quantités de PC différentes. Deux des membranes ont démontrées une haute capacité de liaison pour la PC (78,6 % de la quantité de PC initiale dans la solution test ont été liés) en comparaison à une membrane contrôle (15 % de PC liée par le NIP). Les tests de liaisons ont été réalisés soit dans l'eau, soit dans l'isopropanol. Des phospholipides similaires, le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidyléthanolamine (PE) ont été utilisés pour tester la

sélectivité des deux membranes et celles-ci ont montré une sélectivité pour PC et non pour PI et PE (voir figure 2.1).

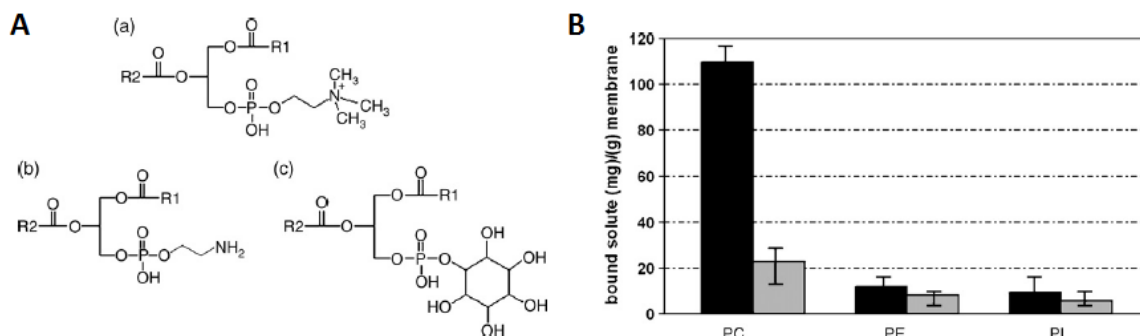


Figure 2.1 : A) Structures chimiques de la phosphatidylcholine PC (a), de la phosphatidyléthanolamine PE (b) et du phosphatidylinositol PI (c). B) Quantités liées de PC, PE et PI au MIP (noir) et au NIP (gris) après le test de sélectivité.

En 2011, Jang *et al.*, [105] ont mis au point une phase solide monolithique à base de MIP pour la séparation par électrochromatographie capillaire puis la caractérisation de phospholipides par couplage à la spectrométrie de masse (ESI-MS-MS). Un MIP principalement composé de S-ketoprofen comme molécule « *dummy template* », d'acide méthacrylique (donneur de liaisons hydrogènes de proton et aussi accepteur de liaisons hydrogènes) comme monomère fonctionnel et d'éthylène glycol diméthacrylate (EDMA) comme agent réticulant a été synthétisé dans un mélange acétonitrile/isopropanol (9 : 1) et a permis de séparer plusieurs espèces de phospholipides (phosphatidylsérines, phosphatidyléthanolamines, phosphatidylglycérols, acide phosphatidique et lysophosphatidylglycérols) selon leur groupement de tête et la longueur de leur chaînes carbonées. Les tests ont été réalisés sur des échantillons d'urine humaine et aucune comparaison avec un NIP n'est évoquée.

En 2014, Narayanaswamy *et al.*, [106] en collaboration avec l'équipe du professeur B. Sellergren ont mis au point une stratégie pour la capture puis l'analyse par spectrométrie de masse de certains phospholipides (mono-esters) et pour l'amélioration de la détection des phosphates de base à longues chaînes, dont la S1P. Un MIP sous forme de monolithe macroporeux dirigé contre la S1P, a été préparé par polymérisation radicalaire (voir figure 2.2 a) puis broyé pour être directement utilisé pour l'extraction en phase solide de la S1P au sein d'une matrice complexe provenant d'une extraction par du méthanol de tissus de cerveaux de souris. La matrice a été enrichie avec des standards lipidiques et contenait naturellement, en plus de la S1P, d'autres phospholipides (mono et di-ester) ainsi que d'autres lipides non phosphate. Le MIP a été synthétisé par copolymérisation entre le monomère fonctionnel bis-imidazolium, connu pour sa capacité à lier spécifiquement les phosphates par des liaisons hydrogènes (voir figure 2.2 b), et l'agent réticulant éthylène glycol diméthacrylate, en présence d'une molécule « *dummy template* », l'acide phosphatidique à la place de la S1P et dans un mélange de toluène et de méthanol. La matrice analysée a été chargée sur la phase

solide à base de MIP dans de l'isopropanol. Un NIP a également été préparé et il a été démontré que l'efficacité de liaison du NIP était plus importante que celle du MIP. Le NIP a donc été utilisé pour l'application finale (il est appelé IMP de l'anglais Imidazolium Polymer). Cette nouvelle phase solide leur a permis de séparer les phosphates mono-esters (ceramide-1-phosphate, sphingosine-1-phosphate, acide phosphatidique et acide lysophosphatidique), pourtant en fraction minoritaire (< 5 % de la masse totale des lipides présents), des phosphates di-esters (phosphatidylcholine, sphingomyéline, lyso-phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol) plus abondants (> 60 %) et des autres lipides non phosphate, non reconnus par leur NIP.

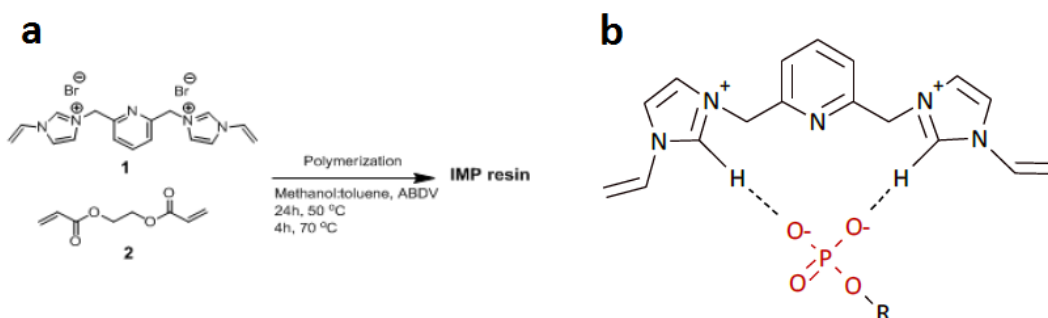


Figure 2.2 : a) Représentation schématique de la synthèse de la résine IMP. b) Monomère fonctionnel bis-imidazolium et interactions avec groupe phosphate par des liaisons hydrogènes.

En 2015, Wang *et al.*, [107] ont mis au point une nouvelle phase solide à base de MIP pour l'extraction de l'acide lysophosphatidique (LPA) dans le plasma humain. L'acide octadécylphosphonique (OPA) a été utilisé en tant que « *dummy template* » (voir figure 2.3 a). Un monomère sur mesure contenant trois groupes urée a été synthétisé et combiné à des monomères classiques (4-VP et MAA) puis mélangé avec le « *dummy template* » (OPA), l'agent réticulant (EDMA) et l'initiateur (AIBN) pour une polymérisation en masse dans du chloroforme (voir figure 2.3 b). Les groupes N-H de l'urée sont réputés pour lier le phosphate par des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques (voir figure 2.3 c).

Un NIP a également été polymérisé en parallèle. Les cinq sous espèces principales de LPA ont pu être séparées des autres phospholipides nativement présents dans le plasma sanguin et connus pour interférer lors de la quantification du LPA (phosphatidylcholine et lysophosphatidylcholine).

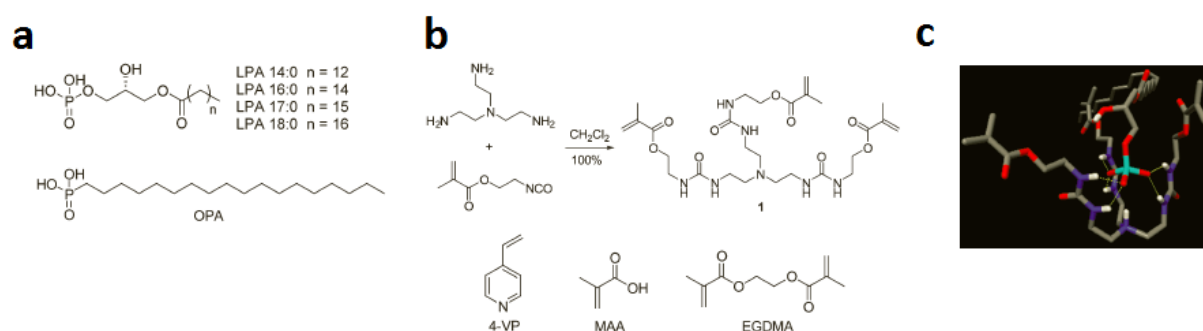


Figure 2.3 : a) Structures des principales sous-espèces de LPA et structure de l'acide octadécylphosphonique. b) Synthèse du monomère urée (haut), autres monomères et agent réticulant employés (bas). c) Modélisation moléculaire du complexe entre le LPA 18 : 1 et le monomère urée (structure de minimum d'énergie). Atomes : Gris = C, blanc = H, rouge = oxygène, bleu = N et cyan = P.

En mars 2017, Sulc *et al.*, [108] ont utilisé des polymères imprimés avec des phospholipides en tant que pièges sélectifs pour une endotoxine (lipopolysaccharide), une toxine située dans les membranes lipidiques externes de certaines bactéries (Gram) et qui est relarguée lors de l'étape de fermentation des microorganismes employée par l'industrie pharmaceutique pour la conception de médicaments et de protéines (voir figure 2.4 a). Une série de monomères urée (figure 2.5) et bis-imidazolium (figure 2.5), ces derniers ayant l'avantage d'être eau-compatible ont été évalués comme possibles récepteurs de groupes phosphates. Pour cela les polymères ont d'abord été synthétisés avec l'acide phénylphosphonique (PPA), un phosphonate mimant le groupe phosphate de tête des phospholipides, en tant que molécule *template* (voir figure 2.5) et des tests ont été réalisés de façon à sonder l'affinité des monomères, puis du polymère pour le phosphate.

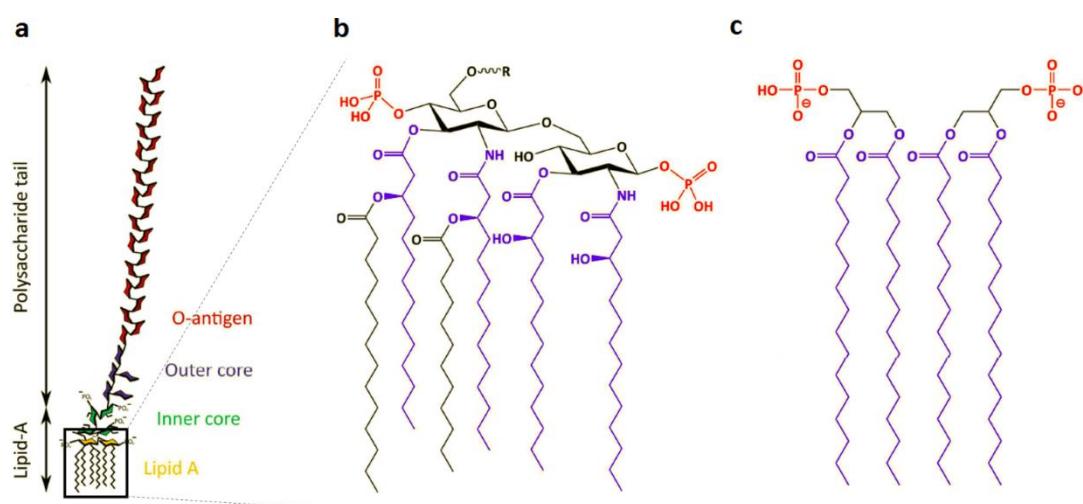


Figure 2.4 : a) Structure générale des endotoxines, b) Région Lipide A ciblée de l'endotoxine, c) Acide phosphatidique comme molécule template.

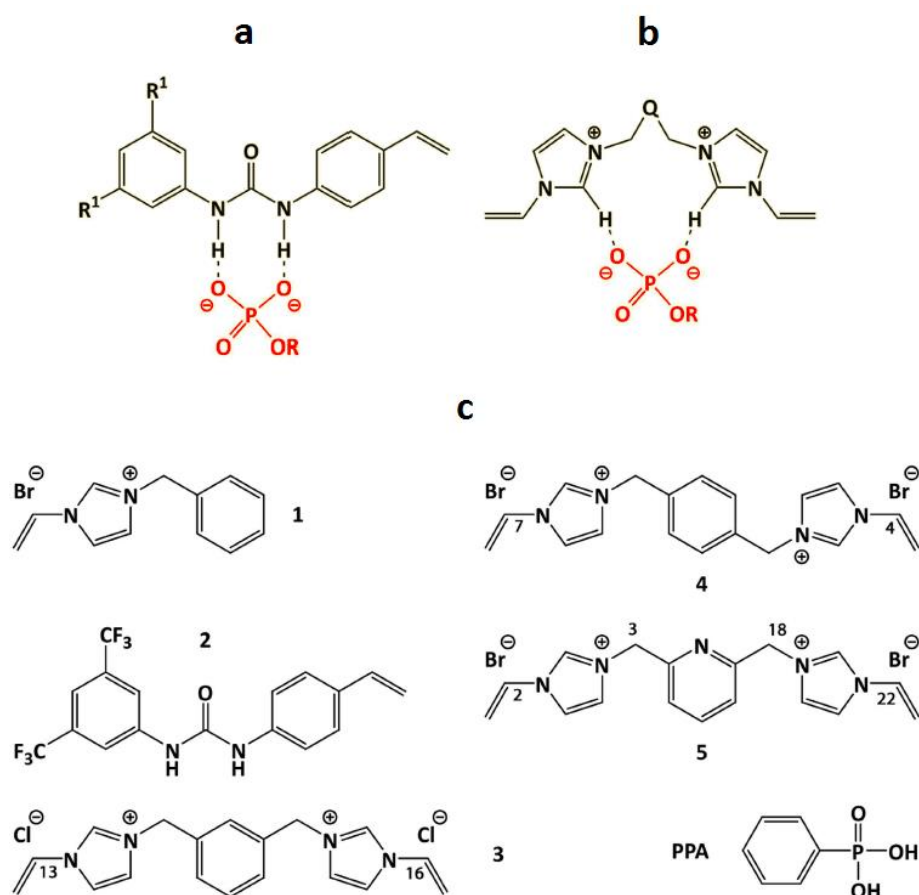


Figure 2.5 : Interactions hydrogènes théoriques entre le groupe phosphate de la molécule template et le monomère 1,3-diarylmurea (a) ou le monomère bis-imidazolium (b). De 1 à 5, monomères sélectionnés pour la préparation d'un MIP sélectif pour un groupe phosphate et molécule dummy template (PPA) utilisée pour prouver l'affinité pour le phosphate des monomères ou du polymère (c).

Les meilleures combinaisons de monomères ont alors sélectionnées et utilisées pour la synthèse d'un MIP pour l'acide phosphatidique (PA) sous sa forme dimérique en tant que molécule « *dummy template* » de l'endotoxine (voir figure 2.4 b et c).

Ce MIP a été préparé avec différents l'éthylène glycol diméthacrylate comme agent réticulant et dans un mélange de méthanol et de toluène. La quantité de PA liée par le MIP a été évaluée dans l'acétonitrile, le méthanol puis le tampon HEPES par trois techniques différentes : la RMN du ^{31}P , la calorimétrie et des mesures de turbidité. Des pourcentages de liaison significatifs par rapport à un polymère contrôle (NIP) et variables selon le solvant utilisé lors du test de liaison ont été observés.

Finalement, Sulc *et al.*, ont abouti à la synthèse de deux polymères capable d'extraire l'entotoxine d'une solution aqueuse jusqu'à une concentration restante inférieure à la limite réglementaire en vigueur dans l'industrie pharmaceutique.

En mai 2017, Ten-Doménech *et al.*, [109] ont décrit une méthode d'extraction et de détermination de certains phospholipides présents dans le gras de lait humain par l'utilisation

d'un MIP comme matériau absorbant d'une extraction en phase solide et d'une technique de chromatographie liquide pour la détection. Le MIP a été synthétisé en utilisant la L- α -phosphatidylcholine (PC) comme molécule *template*, l'acide méthacrylique comme monomère fonctionnel, l'éthylène glycol diméthacrylate comme agent réticulant et l'acétonitrile comme solvant de polymérisation. L'acide méthacrylique est connu pour être à la fois donneur de liaisons hydrogènes et de protons et accepteur de liaisons hydrogènes ce qui le rend adapté pour interagir avec les groupes de tête hydrophiles des phospholipides. La sélectivité du MIP par rapport à d'autres phospholipides différents de la PC a été étudiée. Des tests d'interaction réalisés dans le mélange chloroforme/méthanol (2 : 1) ont permis de démontrer une importante affinité et sélectivité du MIP pour la PC et certains autres phospholipides de structure proche (sphingomyéline et L- α phosphatidyléthanolamine) en comparaison aux NIPs associés (voir figure 2.6).

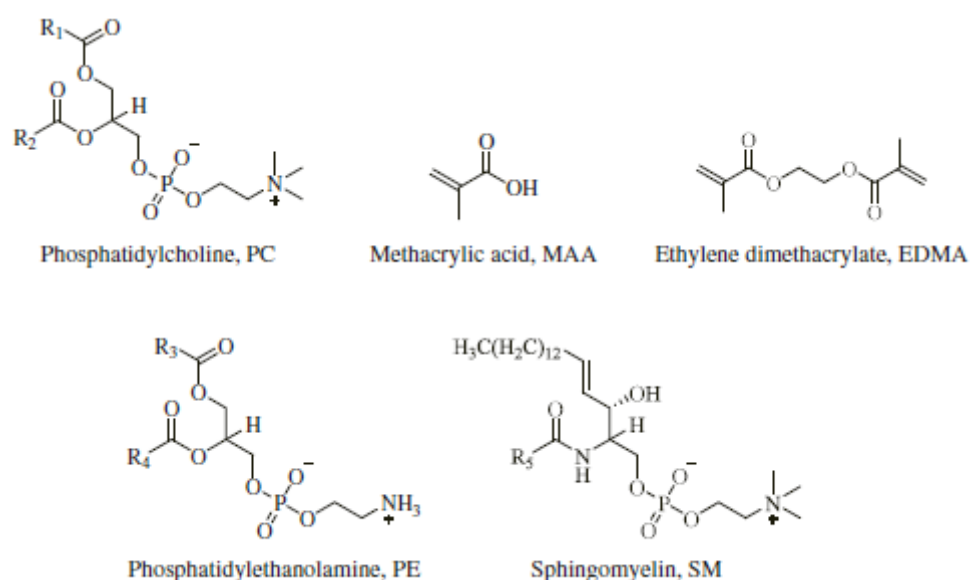


Figure 2.6 : Représentation des structures de la molécule *template* (PC), du monomère fonctionnel (MAA) et de l'agent réticulant utilisés dans le mélange de polymérisation et des phospholipides utilisés pour évaluer la sélectivité du MIP (PE et SM). Les chaînes carbonées sont désignées par R1-R5.

Dans les six travaux référencés, des problèmes de solubilisation des phospholipides, lors de la préparation des MIPs, liés à leur nature amphiphile ont été présentés. La technique classique de préparation des MIPs par polymérisation en masse a été majoritairement employée et seule une équipe a rapporté une technique de polymérisation différente [104]. Quatre équipes sur six [106]–[108], [110] ont réalisé leur MIPs à l'aide d'un « *dummy template* » pour des raisons économiques ou pour éviter le problème de *bleeding* (de l'anglais saignement), terme imagé, employé pour désigner la libération par le MIP d'une certaine quantité de molécule *template* mal extraite (au cours de l'étape d'extraction) pendant la mesure. Ce problème a pour conséquence négative de fausser la quantification du nombre de molécules cibles qui se lient effectivement au MIP pendant la mesure. Sur l'ensemble des travaux, trois types de monomères fonctionnels ont été utilisés, il s'agit de l'acide méthacrylique, du bis

imidazolium et de monomères à base de groupes urées qui font principalement intervenir des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques. Les tests de liaison polymère/molécule cible ont majoritairement été réalisés dans des solvants organiques, sauf pour deux cas où ils ont été menés dans de l'urine humaine [105] et du plasma sanguin humain [107]. Dans tous les travaux, le MIP a été utilisé en tant que phase solide dans une méthode d'extraction et comparé à un NIP, sauf pour l'un d'entre eux où le NIP n'a pas été évoqué [105]. Dans deux des cas, Le MIP et le NIP ont présenté des capacités de reconnaissance similaires pour la molécule cible [106], [107], le NIP a même été utilisé à la place du MIP dans l'un d'entre eux [106]. Dans les autres cas, le NIP était aussi capable de lier la molécule cible mais avec une efficacité significativement moindre. Des tests de sélectivité ont été réalisés et excepté pour l'un des cas [104], aucun MIP ne s'est révélé sélectifs pour une espèce en particulier mais seulement pour une famille de phospholipide ou pour un ensemble d'analogues structuraux.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre était de réaliser la synthèse et l'optimisation d'un nouveau MIP pour la reconnaissance spécifique et la quantification de la S1P libre et circulante, en tant que biomarqueur du mélanome cutané, au sein de fluides biologiques complexes comme le plasma sanguin. Un MIP-S1P 1 a été préparé par thermopolymérisation de masse en utilisant tout d'abord la S1P en tant que molécule *template* et un mélange de solvants organiques comme solvant de polymérisation. Un monomère fonctionnel à base d'amidine non substituée, le (4-acrylamidophényl)-(amino)méthaniminium acétate (AB acétate) a été synthétisé. Ce monomère est capable de former un complexe soluble avec les acides carboxyliques, et probablement avec d'autres oxyanions tels que les phosphates et les phosphonates, dans les solvants polaires et affiche des propriétés de reconnaissance excellentes dans des matrices aqueuses complexes [111], [112].

Dans un premier temps, le pourcentage de liaison de la S1P au MIP-S1P dans du méthanol a été évalué par deux techniques de mesures, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse et la spectroscopie de fluorescence. Un « *dummy template* », l'acide octadecylphosphonique (OPA) a été employé pour évaluer la stœchiométrie et la force de l'interaction entre le monomère AB acétate et la molécule *template* par des mesures de résonance magnétique nucléaire du ^{31}P (le phosphonate de l'OPA permettant de mimer le phosphate de la S1P). Toujours en utilisant l'OPA en tant que molécule « *dummy template* » et le AB acétate comme monomère fonctionnel, un nouveau polymère (MIP-OPA 1) a été synthétisé dans le but d'optimiser la formulation (choix du solvant de polymérisation) et les conditions expérimentales du test de liaison du MIP-S1P 1. Les performances de liaison du MIP-S1P 1 et du MIP-OPA 1 ont été comparées à leur polymères contrôles respectifs (NIP).

Dans un second temps, la sélectivité du MIP-S1P vis-à-vis de la S1P par rapport à un analogue structural (céramide 1-phosphate) a été analysée par des mesures de spectroscopie de fluorescence. Dans le but d'améliorer cette sélectivité, trois stratégies différentes ont été mis en œuvre.

La première stratégie a consisté à remplacer le monomère AB acétate par un monomère basique, le N,N-diéthylaminoethyl méthacrylate (DEAEM), capable de lier le phosphate par une interaction de type acide-base. L'interaction a été caractérisée par des mesures de résonance magnétique nucléaire du ^{31}P puis le DEAEM a été employé pour la synthèse d'un MIP-OPA 2.

La seconde stratégie a consisté à ajouter des monomères fonctionnels hydrophobes en plus du AB acétate dans la formulation du MIP-S1P 1 et de modifier le solvant utilisé lors du test de liaison. Les monomères fonctionnels N-décyl méthacrylate et butyl méthacrylate ont été ajoutés tour à tour et les MIP-S1P 3 et MIP-S1P 4 synthétisés.

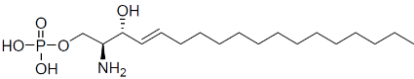
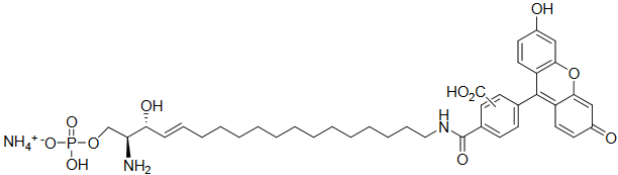
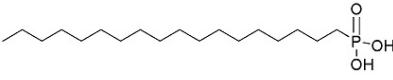
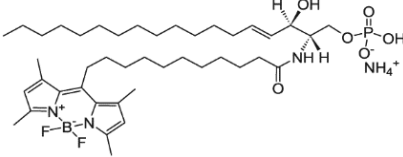
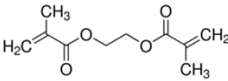
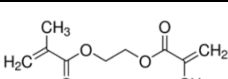
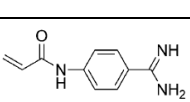
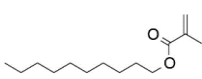
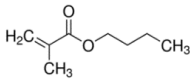
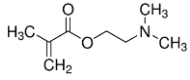


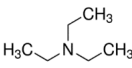
Enfin, dans la dernière stratégie, la formulation du MIP-S1P 1 a été conservée mais le test de liaison a été réalisé dans un solvant différent dans le but de favoriser les interactions spécifiques avec le monomère AB acétate.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Réactifs et matériels

Tous les produits chimiques et les solvants utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich® sauf ceux mentionnés ci-dessous. La sphingosine 1-phosphate (S1P) et la sphingosine 1-phosphate fluorescéine ont été commandées chez Echelon®. Le céramide 1-phosphate fluorescent C11 TopFluor® (C1P TopFluor) provient de chez Avanti Polar Lipids®. Le monomère fonctionnel (4-acrylamidophényl)-(amino)méthaniminium acétate (monomère AB acétate) a été synthétisé selon la procédure décrite dans les travaux de Nestora *et al.*, Panagiotopoulou *et al.*, [111], [112]. La synthèse est décrite dans la partie *Matériels et méthodes*. L'initiateur de polymérisation 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (ABDV) provient de chez DuPont®. Tous les solvants utilisés pour la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse ainsi que le réactif triméthylsilyldiazométhane (2 M dans l'hexane) sont de grade LC-MS et ont été commandés chez Acros Organics®. Le standard interne sphingosine 1-phosphate (S1P d20:1) et le standard sphingosine 1-phosphate (S1P d18:1) proviennent de chez Avanti Polar Lipids®. Les structures des différents composés chimiques utilisées dans ce chapitre sont représentées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Structure chimique des différents composés utilisés dans ce chapitre.

Composé	Utilisation	Structure
S1P	Molécule <i>Template</i> Molécule cible	
S1P fluorescéine	Molécule cible	
OPA	Molécule <i>Dummy template</i>	
C1P Top Fluor	Molécule cible	
EDMA	Agent réticulant	
ABDV	Initiateur	
AB acétate	Monomère fonctionnel	
N-décy méthacrylate	Monomère fonctionnel	
Butyl méthacrylate	Monomère fonctionnel	
DEAEM	Monomère fonctionnel	
Méthanol	Solvant de polymérisation	
Chloroforme	Solvant de polymérisation	
Triéthylamine	Solvant de polymérisation	

2.2.2 Formulations des MIPs

Les formulations des MIPs synthétisés dans ce chapitre sont récapitulées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Formulation détaillée de tous les MIPs préparés dans ce chapitre.

Polymère	Molécule <i>Template</i>	Monomères fonctionnels	Agent réticulant	Initiateur	Solvant
MIP-S1P 1	S1P (0,013 mmol)	AB acétate (0,013 mmol)	EDMA (0,26 mmol)	ABDV (0,0053 mmol)	Méthanol (900 µL) Chloroforme (130 µL) Triéthylamine (90 µL)
MIP-OPA 1	OPA (0,05 mmol)	AB acétate (0,05 mmol)	EDMA (1 mmol)	ABDV (0,0205 mmol)	Méthanol (4000 µL) Triéthylamine (30 µL)
MIP-OPA 2	OPA (0,05 mmol)	DEAEM (0,1 mmol)	EDMA (1 mmol)	ABDV (0,0205 mmol)	Méthanol (4000 µL)
MIP-S1P 2	S1P (0,013 mmol)	AB acétate / N-décy méthacrylate (0,013/0,013 mmol)	EDMA (0,26 mmol)	ABDV (0,0053 mmol)	Méthanol (900 µL) Chloroforme (130 µL) Triéthylamine (90 µL)
MIP-S1P 3	S1P (0,013 mmol)	AB acétate / N-décy méthacrylate / Butyl méthacrylate (0,013/0,013/0,013 mmol)	EDMA (0,26 mmol)	ABDV (0,0053 mmol)	Méthanol (900 µL) Chloroforme (130 µL) Triéthylamine (90 µL)

2.2.3 Méthode de polymérisation

Tous les MIPs de ce chapitre ont été préparés par polymérisation radicalaire libre et en utilisant une même méthode de thermopolymérisation en masse qui a été élaborée au cours de deux séjours (4 mois) réalisés au sein de l'équipe du Professeur Karsten Haupt à l'Université Technologique de Compiègne (GEC / FRE 3580 CNRS).

2.2.3.1 Préparation de la solution de pré-polymérisation

La solution de pré-polymérisation a été préparée en mélangeant la molécule *template*, le monomère fonctionnel, l'agent réticulant et l'initiateur dans un solvant de polymérisation. Dans un tube en verre (4 mL) muni d'un bouchon avec septum, la molécule *template* et le monomère fonctionnel ont d'abord été solubilisés dans le solvant de polymérisation et la

solution a été vortexée pendant 10 minutes et soniquée pendant 2 minutes. Dix minutes après, l'agent réticulant a été ajouté et la solution a été vortexée pendant 30 secondes. En suivant, l'initiateur a été introduit et la solution de pré-polymérisation a de nouveau été vortexée pendant 30 secondes. Enfin, l'oxygène, qui est un inhibiteur de polymérisation, a été évacué du tube à l'aide d'un flux d'azote (1minute/1mL). Cette opération a été effectuée sur glace afin de limiter l'évaporation du solvant lors de l'application du flux d'azote. Le tube a été fermé de façon étanche et conservé au réfrigérateur (4 °C).

2.2.3.2 Méthode de thermopolymérisation en masse

La méthode de thermopolymérisation en masse a été employée. Pour cela, le tube contenant la solution de pré-polymérisation a été maintenu pendant 12 heures dans un bain d'eau à température constante (45 °C). Le polymère obtenu a été transféré dans un tube de centrifugation haute vitesse puis broyé manuellement.

2.2.3.3 Méthode d'extraction de la molécule *template*

Afin d'extraire la molécule *template* piégée dans les empreintes, le polymère a été lavé dans des bains successifs de méthanol/acide acétique (9 : 1 V/V), de méthanol/ammoniac (100 mM), d'eau et de méthanol (3 x 1 heure pour chacun des bains). A la suite de l'extraction, le polymère a été séché sous vide pendant 12 heures puis pesé, de façon à pouvoir calculer le rendement de polymérisation qui équivaut au ratio entre la masse de monomère et d'agent réticulant ajoutés dans la solution de pré-polymérisation et la masse de polymère final obtenue. La poudre de polymère a été stockée au réfrigérateur (4 °C).

2.2.3.3 Méthode de préparation du polymère contrôle NIP (*Non Imprinted Polymer*)

La préparation du NIP a été réalisée de manière identique à celle du MIP mais sans la présence de la molécule *template*. Théoriquement, le NIP ne doit donc pas contenir d'empreinte de la molécule *template*.

2.2.4 Tests de liaison des MIPs

Afin de caractériser la capacité de reconnaissance et de liaison des polymères vis-à-vis de la molécule cible ou bien pour évaluer leur sélectivité, des tests de liaison entre les polymères et la molécule cible ou un analogue structurel de la molécule cible ont été menés. Le principe d'un test de liaison a consisté à exposer dans un solvant une concentration fixe de molécule

cible à une gamme de concentrations de polymère pendant un temps d'incubation puis à mesurer le pourcentage de molécules cibles effectivement liées au polymère pour chaque concentration.

2.2.4.1 Protocole des tests de liaison

Le protocole utilisé pour les tests de liaison est représenté schématiquement dans la figure 2.7. Pour réaliser un test de liaison nous avons préparé plusieurs tubes eppendorfs (2 mL) contenant chacun une concentration identique de molécule cible dans un solvant. Différents volumes d'une suspension mère de polymère ont alors été ajoutés dans chacun des tubes eppendorfs afin d'exposer la molécule cible à une gamme de concentrations de polymère. Tous les tubes ont été complétés avec du solvant jusqu'à atteindre un volume final de 1 mL. Trois tubes supplémentaires contenant la molécule cible à la même concentration mais sans polymère ont fait office de contrôles de la concentration initiale de molécule cible. Trois autres tubes contenant seulement du solvant ont servis de « blanc expérience ». Enfin, un dernier tube contenant une concentration typique de polymère (valeur au centre de la gamme de polymère utilisée) mais sans la présence de la molécule cible a permis de s'assurer qu'il n'y avait pas de relargage au cours de l'expérience, de molécule *template* mal extraite (problème de *bleeding* évoqué dans le chapitre 1).

A la suite d'une incubation sous agitation d'une durée de 8 heures, les tubes ont été centrifugés et le surnageant (800 μ L) a été récupéré pour être analysé. Les molécules cibles liées au polymère au cours de l'incubation restent piégées dans le polymère qui précipite au fond du tube lors de l'étape de centrifugation. L'analyse a donc consisté en la quantification des molécules cibles restantes dans le surnageant, c'est-à-dire celles qui n'ont pas été liées au polymère. Connaissant la concentration initiale de molécule cible on peut ainsi en déduire indirectement le pourcentage de molécules cibles liées en fonction de la concentration de polymère.

Les mesures ont été réalisées soit par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, soit par spectroscopie de fluorescence en utilisant dans ce dernier cas des molécules cibles marquées avec un groupement fluorescent.

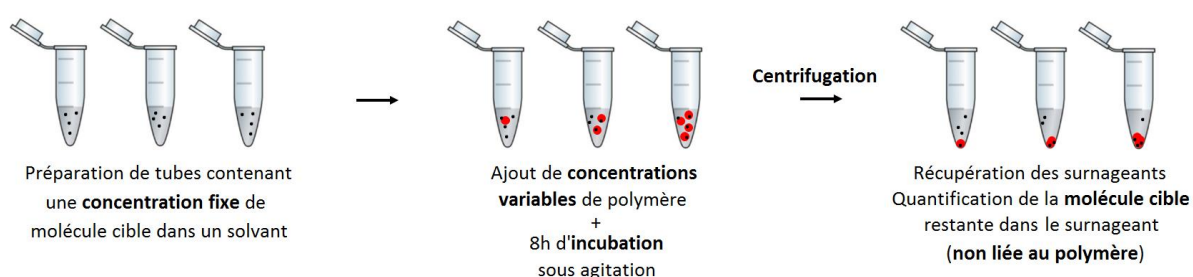


Figure 2.7 : Représentation schématique du protocole du test de liaison.

2.2.4.2 Techniques d'analyse

2.2.4.2.1 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

2.2.4.2.1.1 Principe général

La Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS) est une technique de chimie analytique quantitative qui combine les capacités de séparation physique et chimique de la chromatographie en phase liquide avec la faculté de la spectrométrie de masse à séparer des espèces préalablement ionisées selon leur rapport masse/charge. Plus précisément, la chromatographie en phase liquide repose sur la séparation d'espèces présentes dans une phase mobile, suite à des interactions physiques ou chimiques avec le solide divisé (phase stationnaire) qu'elles traversent. La spectrométrie de masse permet quant à elle de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse ainsi que de caractériser leur structure chimique. Un spectromètre de masse se compose de trois parties principales, une source d'ions, où les ions des espèces à analyser sont produits en phase gazeuse à partir de leur état solide, liquide ou gazeux, un analyseur, dans lequel les ions sont accélérés sous un champ électrique ou magnétique puis séparés en fonction de leur rapport masse/charge, et un détecteur qui compte les ions de différent rapport masse/charge.

2.2.4.2.1.2 Technique et appareils utilisés

Les mesures ont été réalisées en deux temps sur le plateau *MetaToul-Lipidomique* de l'*Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires* (I2MC-UMR1048) de Toulouse. Premièrement, nous avons effectué une extraction lipidique sur chacun des surnageants issus des tests de liaison. Deuxièmement, les échantillons ont été confiés à l'équipe technique du plateau de lipidomique pour la mise en œuvre des étapes de séparation par chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC, de l'anglais *High Performance Liquid Chromatography*) et de spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS).

2.2.4.2.1.2.1 Protocole d'extraction lipidique

Après une centrifugation (10000 RPM - 5 minutes), 500 µL de chaque surnageant ont été prélevés et transférés dans des tubes eppendorfs. Une quantité de 5 ng de standard interne S1P d20:1 a été ajoutée dans chaque tube. La S1P et le standard interne contenus dans les échantillons ont été dérivatisés au contact d'une solution de triméthylsilyl diazométhane (50 µL à 2M dans l'hexane), un réactif commun de méthylation, pendant 10 minutes à température ambiante. Lors de cette étape, les deux groupements hydroxyles (OH) présents sur la tête phosphate de la S1P sont méthylés, c'est-à-dire remplacés par des groupements méthyles (OCH₃) ce qui a pour conséquence de rendre la molécule plus apolaire et de faciliter

l'ionisation. La réaction de dérivation a été stoppée par l'ajout de 6 µL d'acide acétique. Les tubes ont alors été vortexés pendant 30 secondes puis centrifugés (15000 RPM - 6 minutes). Finalement, les surnageants ont été transférés dans des vials en verre avec inserts puis évaporés sous flux d'azote avant d'être repris dans 20 µL de méthanol et stocker au congélateur (-80 °C).

2.2.4.2.1.2.2 Protocole d'analyse HPLC-MS/MS

L'analyse HPLC a été effectuée avec le système Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies) équipé d'un auto-échantillonneur, d'une pompe binaire et d'un four de colonne. La colonne analytique Acquity UPLC BEH C8 (Waters) de dimensions 100 x 2,1 mm, 1,7 µm était maintenue à une température de 35 °C. Les deux phases mobiles A et B étaient respectivement composées d'eau et d'acide formique (99.9:0.1;v/v) et d'acétonitrile et d'acide formique (99.9:0.1, v/v). Les gradients étaient les suivants : 50 % B à 0 min, 60 % B à 2 min, 60 % B à 3 min, 100% B à 4 min, 100% B à 8,5 min et 50 % B à 9 min. Le débit était de 0,3 mL/min. L'auto-échantillonneur était réglé sur 5 °C et le volume d'injection était de 5 µL. Le système HPLC était couplé au spectromètre de masse Agilent 6460 triple quadrupole (Agilent Technologies) équipé d'une source d'ionisation par électroébuliseur (*electrospray ionization*). L'ionisation a été réalisée en mode positif. Les paramètres de la source d'ionisation étaient les suivants : température fixée à 300 °C et débit du gaz de nébulisation (azote) de 10 L/min. La température du flux d'azote à contre-courant était de 300 °C et son débit de 12 L/min. La tension du champ électrique d'ionisation était de +4000 V. L'énergie de collision optimale pour la sphingosine 1-phosphate (d18:1) et la sphingosine 1-phosphate (d20:1) dérivatisées est de 15 eV. Les analyses ont été réalisées en mode de détection SRM (Selected Reaction Monitoring) en utilisant de l'azote comme gaz de collision. Finalement, la détection du pic, l'intégration et les analyses quantitatives ont été réalisées en utilisant le logiciel *MassHunter QqQ Quantitative analysis* (Agilent Technologies) et *Microsoft Excel*.

2.2.4.2.1.2.3 Méthode de calibration par standard interne

La méthode de calibration par standard interne permet la quantification relative de la S1P dans les échantillons. Cette quantification découle de la normalisation de la réponse de l'instrument attribuée à la S1P présente dans les échantillons par celle attribuée au standard interne de référence, ajouté dans chaque échantillon (S1P d20:1) et qui est associée à une courbe de calibration tracée préalablement. Afin de tracer cette courbe de calibration, une gamme de dilution avec un standard de S1P (S1P d18:1) qui est l'équivalent de la S1P présente dans les échantillons a été réalisée dans le méthanol. La même quantité de S1P d20:1 introduite dans les échantillons lors de l'étape d'extraction lipidique a été ajoutée dans chaque tube de cette gamme de dilution. De cette façon, le calcul du ratio entre l'aire du pic dû au standard S1P d18:1 et l'aire du pic dû au standard interne S1P d20:1 pour chaque concentration de la gamme de dilution permet de tracer la courbe de calibration (voir

figure 2.8). Ainsi, lors d'une mesure, l'aire du pic correspondant à la quantité de S1P présent dans l'échantillon sera normalisée par rapport à l'aire du pic correspondant au standard interne S1P d20:1 et le résultat obtenu sera rapporté à la courbe de calibration pour en déduire la concentration relative de S1P.

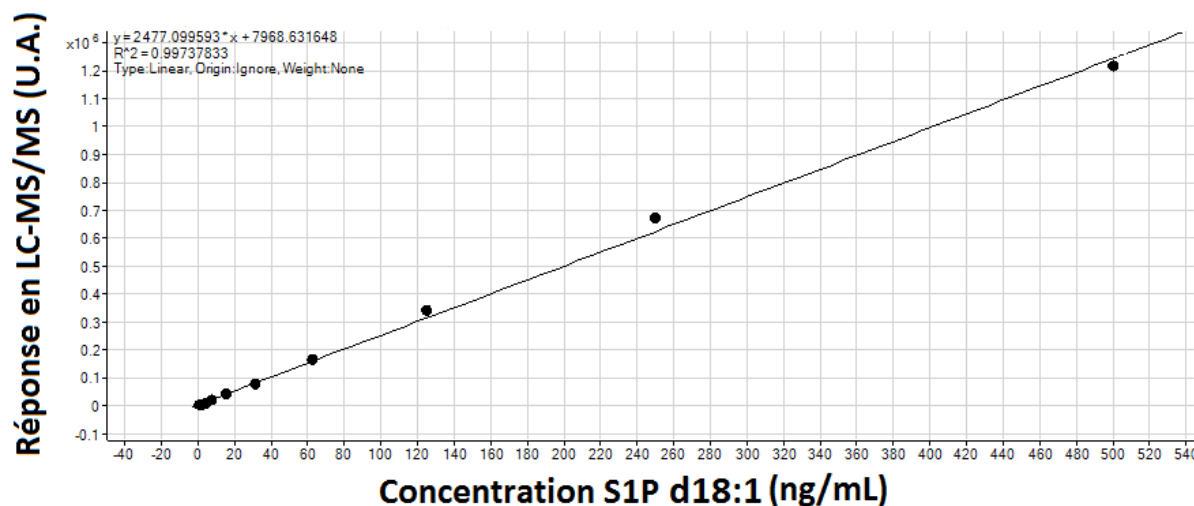


Figure 2.8 : Courbes de calibration de la quantification de la S1P d18:1 dans le méthanol par LC-MS.

2.2.4.2.2 Spectroscopie de fluorescence

2.2.4.2.2.1 Principe général

La spectroscopie de fluorescence est une technique d'analyse semi-quantitative qui repose sur le principe physique de fluorescence. En résumé, lorsqu'un photon d'énergie $h\nu$, avec h la constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s) et ν la fréquence, rencontre une molécule fluorescente, certains électrons des atomes de la molécule fluorescente sont excités par l'absorption du photon et sont amenés à un état électronique de plus haute énergie. Lorsque ces électrons retournent à leur état fondamental de plus basse énergie ils vont émettre un photon de plus basse fréquence (ou de plus grande longueur d'onde λ sachant que $\nu = \frac{c}{\lambda}$ avec c la célérité de la lumière dans le vide). Un spectromètre de fluorescence se compose principalement d'une source lumineuse, d'un détecteur et de filtres ou de monochromateurs pour sélectionner les longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

L'intensité moyenne de fluorescence mesurée dans un échantillon est proportionnelle à la quantité de molécule fluorescente qu'il contient.

2.2.4.2.2.2 Technique et appareils utilisés

Pour les tests de liaison analysés avec la spectroscopie de fluorescence nous avons employé des molécules cibles marquées avec un groupement fluorescent et deux appareils différents ont été utilisés. Il s'agit du spectrofluorimètre Fluorolog® de Horiba Scientific Jobin Yvon® et

du lecteur de plaques multi-puits Varioskan® Flash de Thermo Scientific®. Le spectrofluorimètre Fluorolog® dispose d'une meilleure sensibilité et d'une limite de détection plus basse, cependant, pour réaliser les mesures, les échantillons doivent être placés l'un après l'autre dans une cuve en quartz, contrairement au Varioskan® Flash où tous les échantillons peuvent être analysés automatiquement lors d'une seule acquisition.

2.2.4.2.2.1 Protocole d'analyse avec le spectrofluorimètre Fluorolog®

Les tests de liaison analysés avec le spectrofluorimètre Fluorolog® ont été réalisés avec de la S1P fluorescéine en tant que molécule cible à une concentration de 500 nM dans le méthanol. Chacun des surnageants (500 µL) a été transféré l'un après l'autre dans une cuve en quartz et l'intensité de fluorescence a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation de 487 nm, une longueur d'onde d'émission de 524 nm (slit de 1,5).

2.2.4.2.2.2 Protocole d'analyse avec le Varioskan® Flash

Les tests de liaison analysés avec le Varioskan® Flash ont été réalisés avec de la S1P fluorescéine en tant que molécule cible à une concentration de 5000 nM dans le méthanol seul et de 500 nM dans un mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V), ou bien avec du C1P TopFluor (comme analogue structurel de la S1P) pour le test d'évaluation de sélectivité, à une concentration de 500 nM dans un mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V).

Tous les surnageants (500 µL) ont été répartis dans les puits à fonds ronds d'une plaque 48 puits de culture cellulaire. L'excitation a été effectuée par le haut de la plaque (sans couvercle) et l'émission recueillie en plusieurs points dans un puits est moyennée pour chaque puits. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour la S1P fluorescéine et pour le C1P Topfluor étaient respectivement de 494 nm/521 nm et de 496 nm/511 nm.

2.2.4.2.2.3 Courbes de calibration

La courbe de calibration de la S1P fluorescéine mesurée dans le méthanol avec le spectrofluorimètre Fluorolog® a été tracée (voir figure 2.9 a). De la même façon, les courbes de calibration de la S1P fluorescéine mesurée dans le méthanol ou dans le mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V) (voir figure 2.9 b et c) et du C1P TopFluor mesuré dans le mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V) avec le Varioskan® Flash ont été obtenus (voir figure 2.9 d).

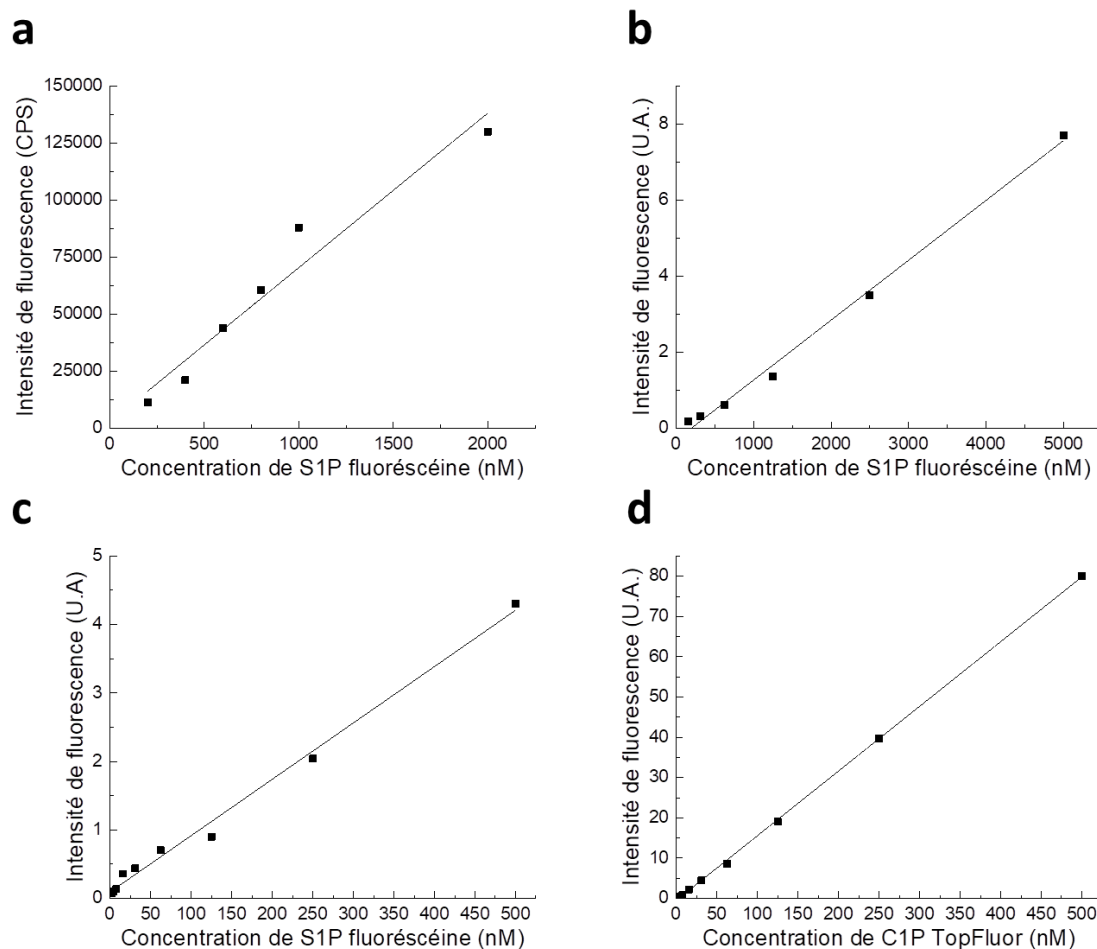


Figure 2.9 : Courbes de calibration de la quantification de la S1P fluorescéine – dans le méthanol avec le spectrofluorimètre Fluorolog® (a) et le Varioskan® Flash (b) – dans le mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V) avec le Varioskan® Flash (c) et courbe de calibration de la quantification de la C1P TopFluor® dans le mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V) avec le Varioskan® Flash (d).

2.2.5 Préparation des solutions lipidiques

Les solutions de S1P, de S1P fluorescéine et de C1P TopFluor ont toutes été préparées à partir des composés sous forme de poudre dans des tubes en verre et les solutions mères ainsi que les aliquots ont été conservés à l'obscurité au congélateur (-20 °C) pendant moins de 3 mois.

2.2.5.1 Solutions de S1P dans le méthanol ou le mélange méthanol/eau

La limite de solubilisation de la S1P dans le méthanol seul est de 0.3 mg/mL [113]. Pour solubiliser la poudre dans le méthanol seul, nous avons alternativement vortexé pendant 2 minutes puis soniqué dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes jusqu'à obtenir une solution claire. Des sous-dilutions pour la préparation d'aliquots ont alors été réalisées soit dans du méthanol seul, soit dans un mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V).

2.2.5.2 Solutions de S1P fluorescéine dans le méthanol et le mélange méthanol/eau

La limite de solubilisation de la S1P fluorescéine dans le méthanol seul est de 1 mg/mL [114]. Pour solubiliser la poudre dans le méthanol seul un volume de 1 mL de méthanol a été ajouté aux 50 µg présent dans le tube en plastique d'origine. La solution a été immédiatement transférée dans un tube en verre puis vortexée pendant 2 minutes à l'obscurité. Des sous-dilutions pour la préparation d'aliquots ont alors été réalisées soit dans du méthanol seul, soit dans un mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V).

2.2.5.3 Solutions de C1P TopFluor® dans le méthanol et le mélange méthanol/eau

La limite de solubilisation du C1P TopFluor dans le méthanol seul n'est pas communiquée par le fournisseur.

Pour solubiliser la poudre dans le méthanol seul un volume de 1 mL de méthanol a été ajouté aux 250 µg présent dans le tube en plastique d'origine. La solution a été immédiatement transférée dans un tube en verre puis vortexée pendant 2 minutes à l'obscurité. Des sous-dilutions pour la préparation d'aliquots ont alors été réalisées soit dans du méthanol seul, soit dans un mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V).

2.2.6 Synthèse du monomère (4-acrylamidophenyl)(amino)methaniminium acetate (AB acétate)

La synthèse a été effectuée en deux étapes (voir figure 2.10). Le (4-acrylamidophenyl)(amino)méthaniminium chloride a d'abord été synthétisé selon le protocole décrit par Beyazit et al., [115]. Trente-quatre grammes (0,25 mol) d'acétate de sodium trihydrate ont été dissout dans 200 mL d'eau et 2 g (9,6 mmol) de 4-aminobenzamidine dihydrochloride ont été ajouté. La solution a été refroidie jusqu'à une température inférieure à 5 °C dans un bain de glace et 4 mL (49 mmol) de chlorure d'acryloyle ont été ajouté goutte à goutte. Après une attente d'1h pour laisser le temps à la réaction d'opérer, le pH a été ajusté à 4 avec de l'acide chlorhydrique (37 %) et une précipitation a été observée. Après filtration, le précipité a été récupéré puis dissout dans 100 mL d'eau à 40 °C. De l'acide chlorhydrique (37 %) a de nouveau été ajouté pour fixer le pH à 1 et le produit a reposé 12h à 4 °C pour permettre la cristallisation. Les cristaux ont été récupérés par filtration et séchés dans un four à 50 °C. Pour la synthèse du monomère AB acétate, 1 g de (4-acrylamidophenyl)(amino)méthaniminium chloride précédemment synthétisé a été suspendu dans 100 mL d'une solution saturée en acétate de sodium et agité pendant 12h. Le produit a été collecté par filtration, lavé avec de l'eau pour éliminer l'acétate de sodium résiduel puis séché à 50 °C.

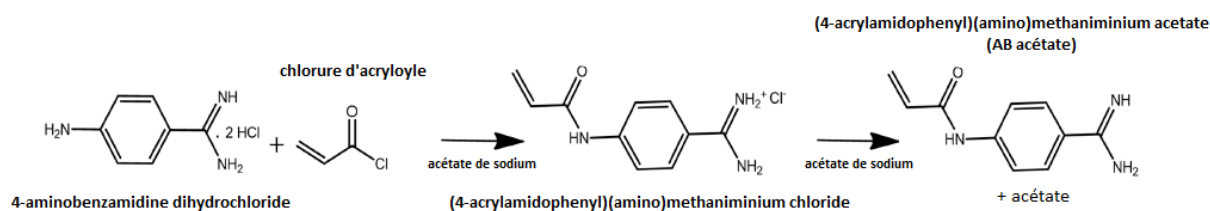


Figure 2.10 : Etapes de la synthèse du monomère fonctionnel AB acétate.

2.2.7 Etudes par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

La spectroscopie RMN est une technique quantitative et structurale basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN). Les études RMN ont été réalisées avec un spectromètre Bruker (400 MHz) à 25 °C dans le but d'étudier la stœchiométrie et la force de l'interaction entre la molécule *template* et le monomère fonctionnel. Les analyses ont été effectuées dans le solvant de polymérisation du MIP associé, sauf le chloroforme qui a été retiré de façon à simplifier l'analyse des résultats et qui n'a *a priori* pas d'impact direct sur les interactions *template*/monomère fonctionnel. Il a été décidé de suivre la variation du déplacement chimique de l'atome de phosphore (^{31}P) présent sur les molécules cibles utilisées, du fait de sa proximité avec le site d'interaction potentiel entre la molécule cible et le monomère fonctionnel. La stœchiométrie de l'interaction a été déterminée par la méthode des variations continues (ou méthode de Job) [116] et les valeurs expérimentales relatives à la courbe de Job obtenue ont été ajustées par un modèle de régression linéaire [117]. La force de l'interaction a quant à elle été évaluée suite à une expérience de titrage et à l'ajustement des données obtenues par un modèle de régression linéaire [117] qui ont permis d'estimer la constante de dissociation [118].

Ainsi, pour l'étude de l'interaction entre la molécule « *dummy template* » acide octadécylphosphonique (OPA, de l'anglais *OctadecylPhosphonic Acid*) et le monomère fonctionnel AB acétate l'analyse RMN a été réalisée dans un mélange de méthanol deutéré et de triéthylamine MeOD/ Et_3N (10 : 1 V/V). Pour le tracé de la courbe de Job, la variation du déplacement chimique, possiblement due à l'interaction entre le monomère AB acétate et le OPA, de l'atome de phosphore du groupe phosphonate de l'OPA a été suivie en fonction de la fraction molaire du monomère AB acétate. Une solution contenant l'OPA et le AB acétate à une concentration totale constante égale à 10 mM a été préparée avec une fraction molaire de AB acétate variant de 0 à 1 par pas de 0,1. La constante de dissociation a été estimée par titrage d'une quantité croissante de AB acétate dans une quantité constante de OPA. Une solution mère de AB acétate à 40 mM a été préparée et ajoutée (de 0 à 10 équivalents) à une concentration fixe de OPA à 2 mM.

De façon similaire, pour l'étude de l'interaction entre la molécule « *dummy template* » acide octadécylphosphonique (OPA, de l'anglais *OctadecylPhosphonic Acid*) et le monomère fonctionnel N,N-diéthylaminoethyl méthacrylate (DEAEM) l'analyse RMN a été réalisée dans

le méthanol deutéré (MeOD) seul. Pour le tracé de la courbe de Job, une solution contenant l'OPA et le DEAEM à une concentration totale constante égale à 10 mM a été préparée avec une fraction molaire de DEAEM variant de 0 à 1 par pas de 0,1. La constante de dissociation a été estimée par titrage d'une quantité croissante de DEAEM dans une quantité constante de OPA. Une solution mère de DEAEM à 40 mM a été préparée et ajoutée (de 0 à 10 équivalents) à une concentration fixe de OPA à 2 mM.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Synthèse et optimisation d'un MIP pour la S1P

2.3.1.1 Synthèse d'un nouveau MIP pour la S1P

La première étape du travail a été de mettre au point la formulation et la méthode de polymérisation d'un MIP spécifique de la S1P et utilisable dans des milieux aqueux tel que le plasma sanguin.

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1, le choix de la formulation dépend avant tout de la molécule cible et des futures conditions d'utilisation du MIP, imposées par l'application visée (par exemple, l'utilisation du MIP dans le plasma sanguin).

Dans un premier temps nous avons décidé d'utiliser la S1P en tant que molécule *template* pour notre MIP.

Compte tenu de sa structure, nous avons recherché un monomère fonctionnel capable d'interagir avec le groupe phosphate de la S1P, comme particularité par rapport à d'autres molécules présentes dans le plasma sanguin. De tels monomères fonctionnels ont été identifiés dans la littérature, par exemple ceux présentés dans l'introduction de ce chapitre (l'acide méthacrylique, le bis imidazolium et les monomères à base de groupes urées), mais aussi le *N,N'*-diéthyl-(4-vinylphenyl)amidine, qui a été synthétisé sur mesure par Wulff *et al.*, dans le but de former des complexes par des interactions non covalentes (dans l'acétonitrile ou le chloroforme) avec plusieurs oxyanions, dont les phosphonates et les phosphates [119]–[121]. Plutôt que d'utiliser un monomère fonctionnel commercial nous avons nous aussi opté pour la synthèse d'un monomère à base d'amidine non substituée, le (4-acrylamidophényl)-(amino)méthaniminium acétate (AB acétate). Ce monomère a été préparé selon le protocole décrit dans la publication de Beyazit *et al.*, [115] mais sous la forme d'un sel d'acétate (voir *Matériels et méthodes*). Il a été démontré que le AB acétate est capable de former un complexe soluble par des interactions électrostatiques avec les acides carboxyliques, et probablement avec d'autres oxyanions tels que les phosphates et les phosphonates, dans des solvants polaires [111], [112]. Le principal avantage du monomère AB acétate par rapport à d'autres monomères fonctionnel est qu'il dispose de propriétés de reconnaissances excellentes lorsqu'il est employé dans des matrices aqueuses complexes [111], [112]. Il semble donc bien adapté à la préparation d'un MIP pour la quantification de la S1P dans le plasma

sanguin. Le monomère AB acétate a ainsi été ajouté à la formulation de notre MIP en quantités molaires stœchiométriques avec la molécule *template*.

Du fait de sa nature amphiphile, la S1P est difficile à solubiliser. Par conséquent, le choix du solvant de polymérisation a été une étape cruciale. Suite à de nombreux tests de solubilisation de la S1P dans différentes solutions de pré-polymérisation, nous avons décidé d'utiliser un mélange de méthanol, de chloroforme et de triéthylamine (10 : 1,44 : 1 V/V/V) en tant que solvant de polymérisation. La triéthylamine s'est révélée indispensable à la solubilisation de la S1P dans le mélange de pré-polymérisation et en termes de quantité molaire, cinquante fois plus de triéthylamine que de monomère fonctionnel AB acétate ont été ajoutés. Il s'agit d'un paramètre important, puisque comme indiqué dans le chapitre 1, les interactions qui peuvent s'établir entre le monomère fonctionnel et les molécules du solvant peuvent avoir un impact critique sur la structure et l'efficacité des sites d'impressions.

L'éthylène glycol diméthacrylate (EDMA), un agent réticulant très classique dans la synthèse des MIPs et qui possède deux doubles liaisons polymérisable en vis-à-vis a été employé dans la formulation de notre MIP.

L'initiateur de polymérisation 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (ABDV) a été ajouté au mélange de pré-polymérisation et le **MIP-S1P 1** a été préparé par une méthode classique de thermopolymérisation en masse (12h à 45 °C) (voir *Matériels et méthodes* et figure 2.11).

Polymère	Molécule <i>Template</i>	Monomères fonctionnels	Agent réticulant	Initiateur	Solvant
MIP-S1P 1	S1P (0,013 mmol)	AB acétate (0,013 mmol)	EDMA (0,26 mmol)	ABDV (0,0053 mmol)	Méthanol (900 µL) Chloroforme (130 µL) Triéthylamine (90 µL)

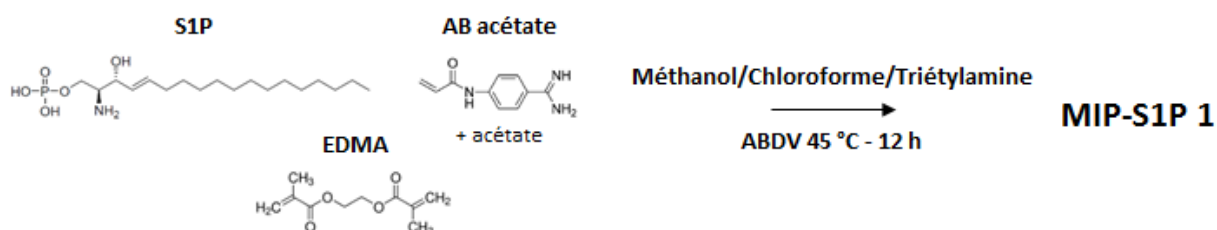


Figure 2.11 : Formulation et voie de polymérisation du MIP-S1P 1.

2.3.1.2 Test de liaison du MIP-S1P 1

Afin d'évaluer les propriétés de reconnaissance du **MIP-S1P 1** pour la S1P, deux tests de liaison tels que présentés dans la partie II.4 de *Matériels et méthodes* ont été réalisés.

Les mesures ont été effectuées par Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS) en utilisant la **S1P** en tant que molécule cible à une

concentration de **700 nM dans le méthanol** et également par spectroscopie de fluorescence (Varioskan® Flash) en utilisant la **S1P fluorescéine** en tant que molécule cible à une concentration de **5000 nM dans le méthanol**. Ces concentrations d'incubation ont été déterminées en fonction des courbes de calibration et de la limite de quantification dans le méthanol des deux méthodes de mesure (voir *Matériels et Méthodes*).

Théoriquement, comme le MIP-S1P 1 a été synthétisé avec la S1P en tant que molécule *template*, ses empreintes moléculaires devraient être uniquement complémentaire de la S1P et non de la S1P fluorescéine. Néanmoins, nous avons fait le choix d'employer la S1P fluorescéine comme molécule cible de substitution de la S1P pour deux raisons principales. Premièrement, malgré ses différences de poids moléculaire (double de celui de la S1P), de taille et de structure (voir figure 2.12) attribuées à la présence du groupement fluorescéine, nous avons fait l'hypothèse qu'elle pourrait être reconnue par le MIP-S1P 1. En effet, le groupement fluorescéine est greffé en bout de chaîne carbonée et pourrait ne pas perturber les interactions entre le monomère fonctionnel AB acétate et le groupe phosphate de la S1P fluorescéine. De plus, il est probable que la S1P fluorescéine soit capable de diffuser à travers la porosité micrométrique du MIP et de se lier, au moins en partie à certains sites de reconnaissance bien exposés, sans pour autant que la reconnaissance de forme et de taille soit totale. Il est possible dans ce dernier cas, que la capacité de liaison du MIP-S1P 1 pour la S1P fluorescéine soit réduite par rapport à celle pour la S1P.

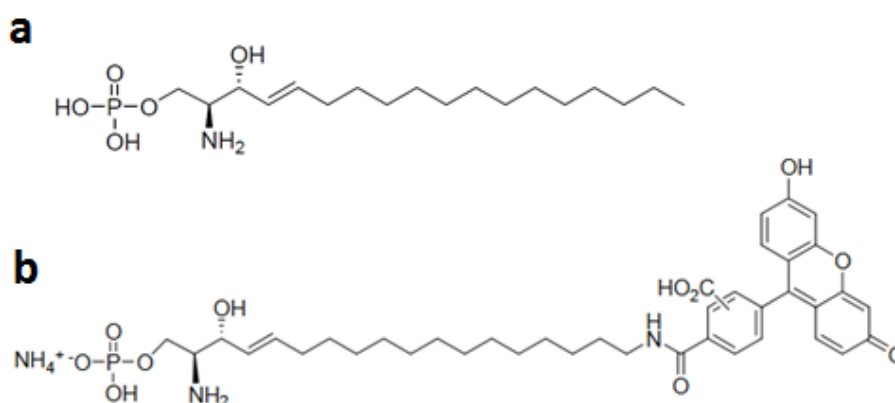


Figure 2.12 : Structures de la S1P (a) et de la S1P fluorescéine (b).

Deuxièmement, l'utilisation de la S1P fluorescéine en tant que molécule cible nous a permis de mener des tests de liaison par spectroscopie de fluorescence qui sont beaucoup plus simple et rapide à mettre en œuvre que ceux réalisés en LC-MS.

Pour les tests de liaison, les molécules cibles ont été exposées à des concentrations variables de MIP-S1P 1 (de 0 à 3 mg/mL pour la S1P et de 0 à 4 mg/mL pour la S1P fluorescéine). Il est souvent recommandé de réaliser le test de liaison dans le même solvant que celui utilisé lors de la polymérisation afin de favoriser la réapparition des mêmes interactions [122]. Dans notre cas, ils ont été réalisés dans le **méthanol seul**. Il s'agit d'un solvant polaire qui favorise

les interactions électrostatiques, il est donc parfaitement adapté dans le cadre de l'utilisation du monomère AB acétate [111]. Les résultats des deux tests de liaison sont présentés dans la figure 2.13 a et b.

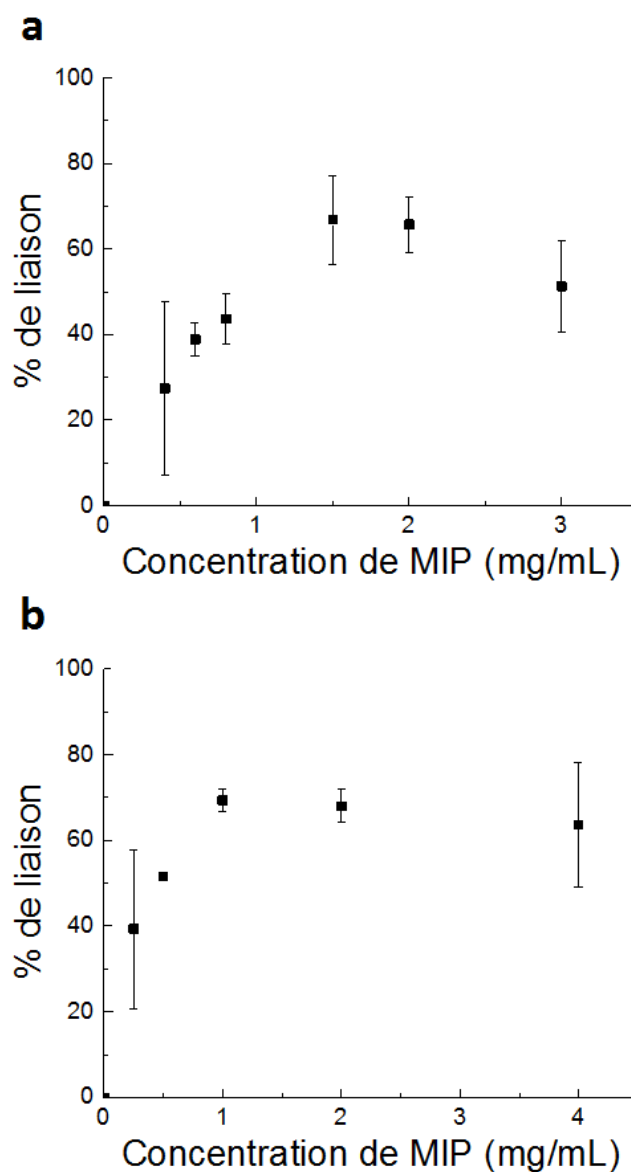


Figure 2.13 : Tests de liaison du MIP-S1P 1 pour la S1P (a) et pour la S1P fluorescéine dans le méthanol (b) (N=2).

Nous pouvons voir que les pourcentages de liaison de la S1P et de la S1P fluorescéine au MIP-S1P 1 augmentent avec la concentration de MIP-S1P 1 jusqu'à atteindre un palier correspondant à un pourcentage de liaison d'environ 65 % pour la S1P et 70 % pour la S1P fluorescéine. Le palier est atteint pour une concentration de MIP-S1P 1 de l'ordre de 1,5 mg/mL pour la S1P et de 1 mg/mL pour la S1P fluorescéine.

Nous observons également une légère diminution du pourcentage de liaison de la S1P pour la concentration du MIP-S1P 1 égale à 3 mg/mL.

Il est intéressant de constater que la liaison de S1P fluorescéine au MIP-S1P 1 est similaire à celle de S1P, malgré les différences structurelles déjà évoquées. La légère différence entre les pourcentages de liaison maximale ne semble pas significative compte tenu des barres d'erreurs. Si les liaisons observées sont bien dues à des interactions spécifiques ce résultat pourrait confirmer notre première hypothèse concernant la liaison possible de la S1P fluorescéine au MIP-S1P 1.

La différence de concentration de MIP-S1P 1 pour laquelle le palier est atteint pourrait s'expliquer par le fait que la concentration de S1P fluorescéine (5000 nM) était plus de sept fois supérieure à celle de S1P (700 nM). Pour une même concentration de MIP-S1P 1, la présence d'un nombre plus important de molécule cible en solution aurait pu augmenter les chances d'interaction avec les monomères fonctionnels et donc le pourcentage de liaison.

Si on considère que la diminution du pourcentage de liaison de la S1P pour une concentration de MIP-S1P 1 égale à 3 mg/mL est significative on peut imaginer qu'elle puisse être causée par le problème de « bleeding » décrit dans le chapitre 1. Il est en effet possible que de la S1P mal extraite, piégée dans le MIP au moment de sa synthèse ait été relarguée en solution au cours du test de liaison. Cela aurait pu avoir pour conséquence une augmentation de la valeur de concentration de S1P dans le tube du test de liaison qui ce serait traduite par une diminution apparent du pourcentage de liaison. Ce phénomène est d'autant plus important que la concentration de polymère est élevée, une grande concentration de MIP ayant plus de chance de contenir une plus grande concentration de S1P mal extraite. Un autre avantage de l'utilisation de la S1P fluorescéine est que les effets du problème de « bleeding » ne sont pas directement observés puisque les concentrations de S1P non fluorescente ne sont pas quantifiées.

2.3.1.3 Evaluation RMN de la stœchiométrie et de la force des interactions

Afin de savoir si les liaisons observées étaient dues à des liaisons spécifiques nous avons cherché à évaluer les interactions probables entre la molécule *template* et le monomère fonctionnel AB acétate.

Pour cela, des études de spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été utilisées. Pour des raisons économiques nous avons décidé de réaliser ces tests de RMN à l'aide d'un « *dummy template* ». Nous avons choisi l'acide octadécylphosphonique (OPA), une molécule structuellement proche de la S1P (voir figure 2.14) et possédant un groupe phosphonate dont on a vu qu'il pouvait mimer le groupe phosphate de la S1P [108].

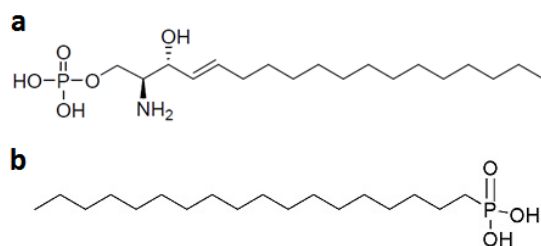


Figure 2.14 : Structures de la S1P (a) et du OPA (b).

Comme décrit précédemment (voir *Matériels et méthodes*) les analyses RMN ont été effectuées dans un mélange de méthanol deutéré et de triéthylamine (10 : 1 V /V) afin de se placer dans les mêmes conditions que lors de la polymérisation. Les variations du déplacement chimique de l'atome de phosphore (^{31}P) ont été suivies du fait de sa proximité avec le site d'interaction potentiel. La stœchiométrie de l'interaction a été déterminée par la méthode des variations continues (ou méthode de Job) et les valeurs expérimentales ajustées par un modèle de régression linéaire. La force de l'interaction a été évaluée par l'estimation de la constante de dissociation suite à une expérience de titrage et à l'ajustement des données par un modèle de régression linéaire. Les résultats des tests de RMN sont présentés dans la figure 2.15.

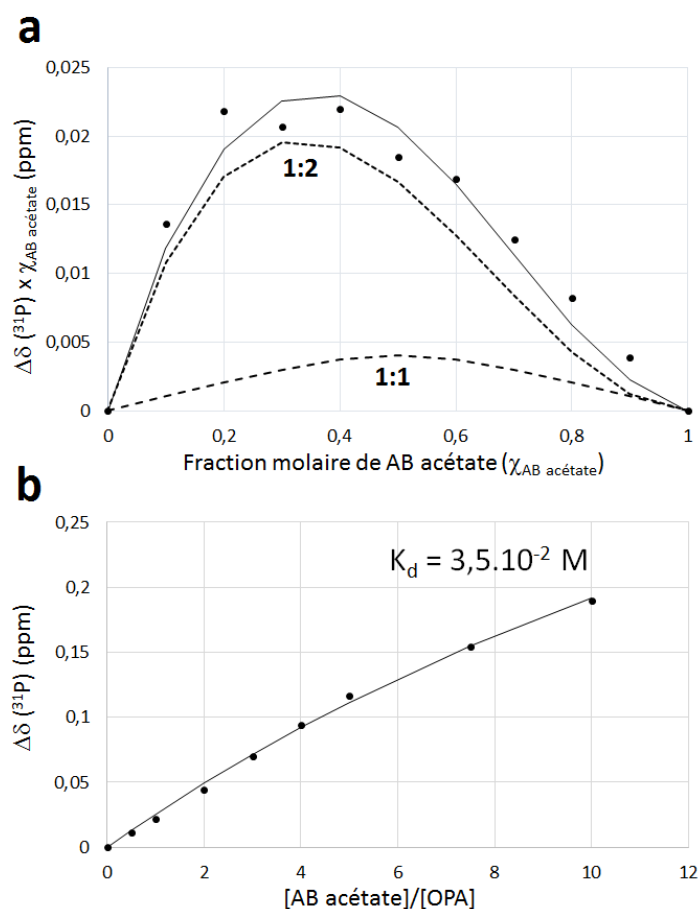


Figure 2.15 : Résultats des tests RMN - a) Courbe de Job. Les points correspondent aux valeurs expérimentales, les traits en pointillés aux composantes du modèle d'ajustement pour les stœchiométries 1:1 et 1:2 et le trait plein à l'ajustement des données expérimentales obtenu par la somme des deux composantes. **b) Courbe de titrage.** Les points correspondent aux valeurs expérimentales et le trait plein à l'ajustement des données.

Nous constatons que la variation du déplacement chimique ($\Delta\delta$) de l'atome de phosphore (^{31}P) du groupe phosphonate du OPA en fonction de la fraction molaire de AB acétate est très faible (0,025 ppm pour la valeur maximale) ce qui traduit une faible interaction. La composante de stœchiométrie 1 : 2 prédomine ce qui suggère une interaction d'une molécule

de OPA pour deux molécules de AB acétate dans le mélange MeOD/Et₃N (10 : 1 V/V). Le titrage permet d'estimer une constante de dissociation du complexe de stœchiométrie 1 : 2 environ égale à $3,5 \cdot 10^{-2}$ M. Cette valeur est très élevée ce qui confirme que l'interaction est très faible. A titre de comparaison, les constantes de dissociation pour les MIPs sont en général de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-12} M [123]. Cependant, cette constante de dissociation a été estimée alors que les valeurs ne tendaient pas vers une valeur constante (on parle habituellement de « plateau » et il traduit le fait qu'à partir d'une certaine concentration limite, l'ajout de AB acétate n'a plus d'impact sur le déplacement chimique), et sa valeur doit donc être nuancée.

Notre hypothèse pour expliquer cette faible interaction est que la triéthylamine basique ajoutée au solvant de polymérisation pourrait interagir via des interactions acide/base avec le groupe phosphonate du OPA (considéré comme acide) et rentrer ainsi en compétition avec le monomère AB acétate.

2.3.1.4 Optimisation du MIP-S1P 1 à l'aide d'une molécule « *dummy template* »

Afin d'améliorer la force des interactions spécifiques, nous avons souhaité optimiser la formulation du MIP-S1P 1. Pour les mêmes raisons économiques que précédemment nous avons décidé de synthétiser un MIP avec le OPA en tant que molécule « *dummy template* » nous permettant de mener de nombreuses optimisations à moindres coûts. Toutes ses optimisations ne sont pas rapportées dans ce manuscrit mais nous avons choisi de présenter les optimisations qui concernent la réduction de la quantité de triéthylamine dans le solvant de polymérisation, ainsi que les conditions expérimentales du test de liaison (concentration de molécule cible, valeurs de la gamme de concentration de polymère). Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce chapitre, l'utilisation d'une molécule « *dummy template* » pour la synthèse d'un MIP est très courante [106]–[108], [110]. De plus, le OPA et une autre molécule contenant un groupe phosphonate (acide phénylphosphonique) ont déjà été utilisés en tant que molécule « *dummy template* » pour la préparation de MIPs ciblant des lipides phosphates (acide lysophosphatidique et acide phosphatidique) [107], [108] ce qui nous a conforté dans notre stratégie.

Le **MIP-OPA 1** a donc été synthétisé (voir figure 2.16) dans un mélange méthanol/triéthylamine (130 : 1 V/V) mais en réduisant considérablement la quantité molaire de triéthylamine par rapport à la quantité de AB acétate (de cinquante fois à plus que quatre fois plus que de AB acétate). L'utilisation de l'OPA à la place de la S1P nous a permis de multiplier par quatre (à ratio molaire constant) toutes les quantités et d'aboutir à une masse finale de MIP plus importante, rendant possible la réalisation de nombreuses optimisations.

Polymère	Molécule <i>Template</i>	Monomères fonctionnels	Agent réticulant	Initiateur	Solvant
MIP-OPA 1	OPA (0,05 mmol)	AB acétate (0,05 mmol)	EDMA (1 mmol)	ABDV (0,0205 mmol)	Méthanol (4000 μ L) Triéthylamine (30 μ L)

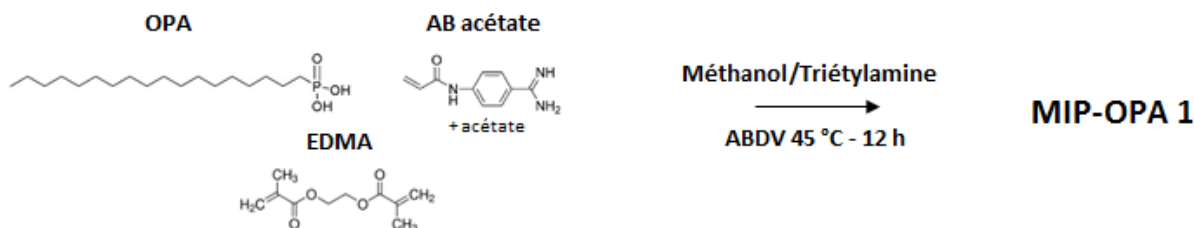


Figure 2.16 : Formulation et voie de polymérisation du MIP-OPA 1.

Afin d'évaluer les propriétés de reconnaissance du **MIP-OPA 1** pour la S1P, un test de liaison a été réalisé. Les mesures ont été effectuées par spectroscopie de fluorescence (spectrofluorimètre Fluorolog®) en utilisant la **S1P fluorescéine** en tant que molécule cible à une concentration de **500 nM dans le méthanol**. L'utilisation du spectrofluorimètre Fluorolog® (qui possède une limite de quantification plus faible) plutôt que du Varioskan® Flash nous a permis de diviser la concentration de molécule cible par dix (de 5000 à 500 nM). La S1P fluorescéine a été exposée à des concentrations variables de **MIP-OPA 1** réduites (**de 0 à 1 mg/mL**) et le test de liaison a été réalisé dans le **méthanol seul**. Les résultats sont présentés dans la figure 2.17.

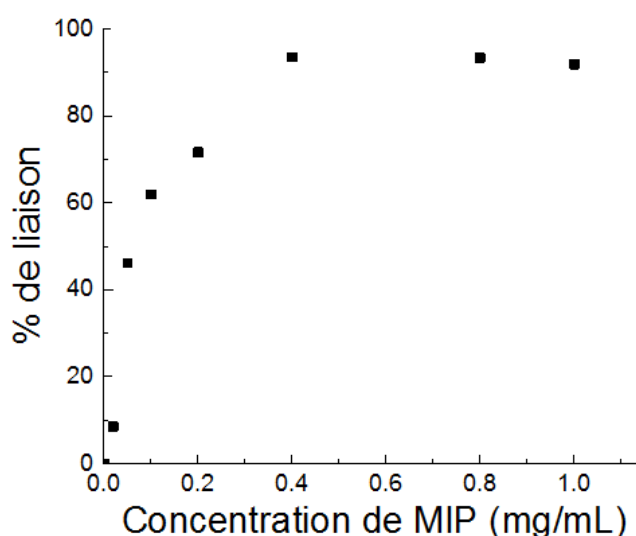


Figure 2.17 : Tests de liaison du MIP-OPA 1 pour la S1P fluorescéine dans le méthanol (N=1).

Nous pouvons voir que le pourcentage de liaison de la S1P fluorescéine au MIP-OPA 1 augmentent progressivement avec la concentration de MIP-OPA 1 jusqu'à atteindre un palier correspondant à un pourcentage de liaison d'environ 90 %.

Tout d'abord, il est intéressant de constater que la S1P fluorescéine puisse se lier au MIP-OPA 1. Ce résultat semble montrer que le AB acétate est bien capable de former des liaisons avec le groupe phosphonate du OPA ce qui tendrait à valider notre stratégie d'utilisation de cette molécule « *dummy template* » pour la synthèse d'un MIP.

La capacité maximale de liaison a été améliorée de 70 à 90 % par rapport au MIP-S1P. Il est probable que cette amélioration soit la conséquence de la réduction de la quantité de triéthylamine lors de la synthèse qui aurait pu avoir pour effet d'augmenter le nombre de molécules d'OPA en état de se lier au monomère fonctionnel et d'améliorer la densité d'empreintes moléculaires. L'amélioration de la capacité maximale de liaison peut aussi être due à la baisse de la concentration de la S1P fluorescéine et des valeurs de la gamme de concentration du MIP utilisées lors du test de liaison. Dans le cas du MIP-S1P 1 il est possible que les trop grandes concentrations de molécule cible et de polymère soient contre-productives et que les interactions soit limitées par encombrement stérique. Enfin, les différences entre les résultats obtenus avec le MIP-OPA 1 et le MIP-S1P 1 peuvent provenir du fait que la molécule *template* utilisée pour leur préparation est différente.

Nous avons voulu transférer les optimisations réalisées à l'aide du MIP-OPA 1 pour la synthèse d'un nouveau MIP-S1P. Malheureusement, contrairement à l'OPA, la S1P n'était pas soluble dans un solvant contenant une quantité aussi faible de triéthylamine. Nous avons donc synthétisé le MIP-S1P 1 en gardant la formulation de base mais nous avons réalisé un nouveau test de liaison dans les conditions expérimentales optimisées lors du test de liaison du MIP-OPA 1. En parallèle, le polymère contrôle NIP qui ne possède pas d'empreintes de la molécule *template* a été synthétisé et employé pour la réalisation du test de liaison.

Les mesures ont été effectuées par spectroscopie de fluorescence (spectrofluorimètre Fluorolog®) en utilisant la **S1P fluorescéine** en tant que molécule cible à une concentration de **500 nM dans le méthanol**. La S1P fluorescéine a été exposée à des concentrations variables de **MIP-S1P 1 et du NIP associé (de 0 à 1 mg/mL)** et les tests de liaison ont été réalisés dans le **méthanol seul**. Les résultats sont présentés dans la figure 2.18.

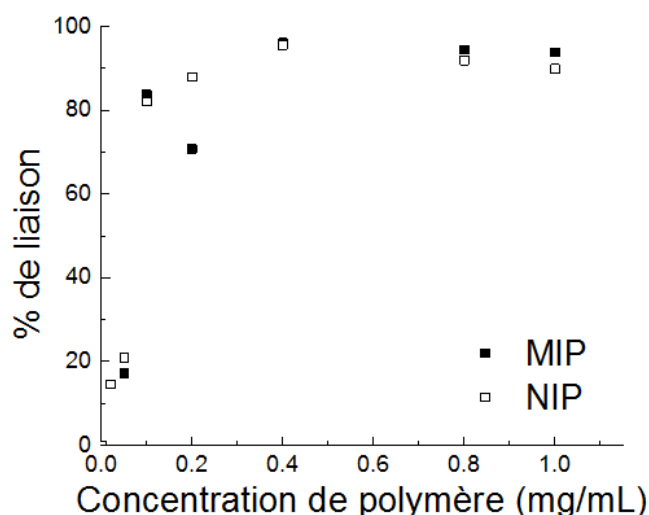


Figure 2.18 : Tests de liaison du MIP-S1P 1 et du NIP associé pour la S1P fluorescéine dans le méthanol (N=1).

Nous pouvons voir que le pourcentage de liaison de la S1P fluorescéine au MIP-S1P 1 augmentent progressivement avec la concentration de MIP-S1P 1 jusqu'à atteindre un palier correspondant à un pourcentage de liaison d'environ 90 %.

De nouveau, la capacité de liaison maximale est améliorée de 70 à 90 %. Cette fois, cette amélioration ne peut pas être due à la réduction de la quantité de triéthylamine. Il se pourrait que notre hypothèse de départ concernant l'effet négatif de la triéthylamine sur les interactions molécule cible/monomère fonctionnel AB acétate ne soit pas avérée. Dans ce cas, l'amélioration de la capacité maximale de liaison semble plutôt provenir de la diminution de la concentration de S1P fluorescéine et de polymère pendant le test de liaison.

Nous constatons que les résultats obtenus avec le NIP sont similaires ce qui relativise fortement le pouvoir de reconnaissance de forme et de taille habituellement associé aux MIPs. En réalité, la communauté scientifique du domaine des MIPs accorde peu d'attention aux NIPs tant leur propriété de liaison sont difficiles à prédire. Les NIPs sont généralement considérés comme capable de former des liaisons non spécifiques avec des analytes de classes variées tandis que le MIP devrait cibler une molécule ou une famille de molécules de façon très spécifique [124]. Cependant ce paradigme a récemment été remis en question [125]. La nouvelle hypothèse suggère que la présence de la molécule *template* lors de la synthèse des MIPs a uniquement pour conséquence d'augmenter les propriétés de liaison déjà existantes dans les NIPs du fait de la seule présence des monomères fonctionnels au sein de la matrice polymérique. Toutefois dans notre cas la capacité de liaison du NIP paraît être identique à celle du MIP. Nous avons imaginé plusieurs hypothèses permettant d'expliquer ce résultat. Premièrement, il est possible que les sites d'impressions ne soient pas totalement formés à cause d'un problème de solubilité de la S1P au cours de la polymérisation. Même si la S1P semble soluble dans la solution de pré-polymérisation, il ne peut pas être exclu qu'elle précipite au cours de la polymérisation, bien que l'exposition à la chaleur lors de la

polymérisation devrait limiter ce problème. Deuxièmement, il se peut que lors de la polymérisation les conditions physico-chimiques du solvant (type de solvant, pH, température) entraînent la formation d'agrégats ou de micelles de S1P. Dans ce cas, les empreintes formées pourraient être celles d'agrégats ou de micelles et non pas de la molécule libre. Une perspective importante à ce travail sera de déterminer dans nos conditions expérimentales la concentration critique micellaire (CMC) de la S1P, c'est-à-dire la concentration limite à partir de laquelle les molécules en solution s'assemblent naturellement en micelles puis en agrégats. Cette détermination peut par exemple se faire par des mesures de spectroscopie par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ou par une méthode de titrage calorimétrique isotherme (ITC). A titre d'exemple, la CMC de la S1P dans un milieu aqueux est d'environ 12 μM et les micelles se transforment en agrégats de taille plus importante (de l'ordre du micromètre) pour une concentration supérieure à 1 mM [18].

Lors de la préparation du MIP-S1P 1 nous utilisons une concentration de S1P de 2,63 mM (soit deux cent fois supérieure à la CMC en milieu aqueux) mais dans le mélange méthanol/chloroforme/triéthylamine pour lequel la CMC doit être logiquement bien plus élevée (cela méritera d'être vérifié). Troisièmement, la formation des sites d'impressions et la résonance moléculaire lors du test de liaison sont peut être rendu difficile par les propriétés de mobilité et de repliement des chaînes carbonées de la S1P. Enfin, il se pourrait que le problème soit dû au fait que contrairement à la S1P utilisée comme molécule *template*, la S1P fluorescéine utilisée molécule cible contient un groupement fluorescent encombrant qui ne l'empêche pas d'interagir avec le monomère fonctionnel mais qui ne lui permet pas de se loger à l'intérieur d'une empreinte moléculaire.

Il s'agit d'un problème courant et dans deux des articles présentés dans l'introduction, des comportements similaires entre le MIP et le NIP ont aussi été rapporté [106], [107]. Narayanaswamy *et al.*, dont l'objectif initial était la synthèse d'un MIP pour l'extraction de la S1P ont finalement décidé d'employer le NIP associé pour leur application finale.

En conclusion de cette sous partie, nous pouvons dire que le MIP-S1P 1 utilisé dans les conditions expérimentales optimisées possède une capacité de liaison maximale d'environ 90 % pour la S1P fluorescéine. Cette capacité de liaison semble surtout dépendre des interactions entre la molécule cible et le monomère fonctionnel et non pas d'une reconnaissance de forme et de taille de la molécule cible grâce aux empreintes moléculaires. Pour cette raison, le MIP est capable de lier la S1P fluorescéine malgré la présence du groupement fluorescent. Si l'on en croit ces expériences ainsi que celles réalisées avec l'OPA, le MIP-S1P 1 pourrait probablement lier toutes les molécules contenant un groupe phosphate ou un groupe phosphonate. Ce dernier point pose la question de la sélectivité du MIP qui est nécessaire à notre application et qui sera l'objet de la prochaine partie.

En termes de quantité, le MIP-S1P 1 est capable de lier 90 % d'une concentration initiale de 500 nM de S1P fluorescéine. Pour rappel, la concentration de S1P dans le plasma sanguin est comprise entre 200 et 1000 nM mais elle y circule majoritairement sous une forme liée aux lipoprotéines de haute densité (55 %), à l'albumine (35 %) et aux lipoprotéines de basse et très basse densité (< 10 %) [45]–[48]. La concentration maximale de S1P sous forme libre est

estimée à 45 nM. L'ordre de grandeur de la capacité de liaison du MIP-S1P paraît donc cohérent par rapport à cette valeur mais il faudra la réévaluer dans le plasma sanguin contenant de nombreuses autres molécules interférentes.

2.3.2 Evaluation et optimisation de la sélectivité du MIP pour la S1P

2.3.2.1 Evaluation de la sélectivité du MIP-S1P 1

La sélectivité du MIP est extrêmement importante dans notre cas puisque l'objectif final est de quantifier spécifiquement la forme libre de la S1P dans le plasma sanguin qui contient un nombre importants d'autres molécules biologiques, y compris des analogues structuraux de la S1P (acide lysophosphatidique, sphingosylphosphocholine, sphingosine, sphinganine 1-phosphate, céramide 1-phosphate, sphingomyeline). La sélectivité du MIP repose sur l'efficacité du processus de formation des empreintes moléculaires qui dépend principalement de la stabilité du complexe molécule *template*/monomère fonctionnel et par conséquent du type de monomère fonctionnel et de solvant utilisés [126], mais aussi de la forme, de la taille et des fonctionnalités de la molécule cible [127].

Afin d'évaluer la sélectivité du MIP-S1P 1, nous avons réalisé un test de liaison avec du céramide 1-phosphate fluorescent (C1P TopFluor®) en tant que molécule cible et comparé les résultats obtenus avec ceux d'un test de liaison identique mais réalisé avec la S1P fluorescéine comme molécule cible. Nous avons fait le choix d'utiliser le C1P TopFluor® parce qu'il s'agit d'un analogue structural proche de la S1P mais qui est constitué de deux chaînes carbonées, contrairement à la S1P qui n'en possède qu'une (voir figure 2.19).

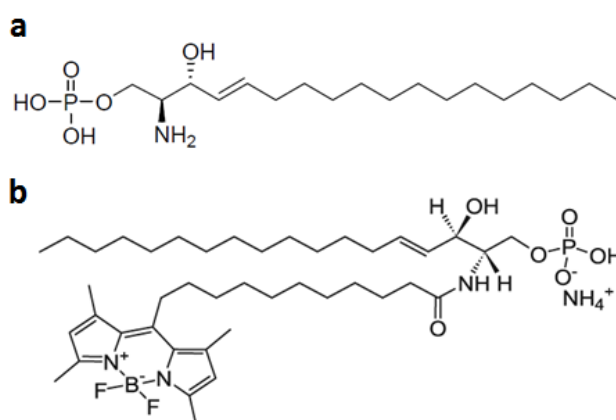


Figure 2.19 : Structures de la S1P (a) et du C1P TopFluor® (b).

Les mesures des deux tests de liaison ont été effectuées par spectroscopie de fluorescence (spectrofluorimètre Fluorolog®) en utilisant le **C1P TopFluor®** et la **S1P fluorescéine** en tant que molécules cibles à une concentration de **500 nM dans le méthanol**. Les molécules cibles

ont été exposées à des concentrations variables de **MIP-S1P 1 (de 0 à 1 mg/mL)** et les tests de liaison ont été réalisés dans le **méthanol seul**. Les résultats sont présentés dans la figure 2.20.

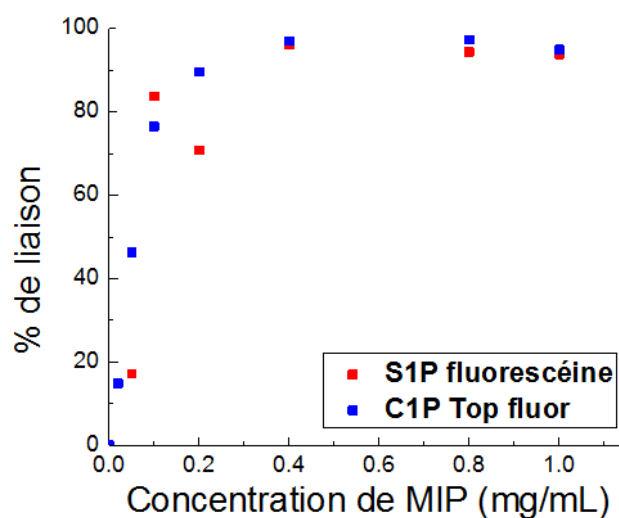


Figure 2.20 : Tests de liaison du MIP-S1P 1 pour le C1P Top fluor et la S1P fluorescéine dans le méthanol (N=1).

Nous constatons des résultats similaires pour le C1P TopFluor® et la S1P fluorescéine. Le pourcentage de liaison augmentent progressivement avec la concentration de MIP-S1P 1 jusqu'à atteindre un palier correspondant à un pourcentage de liaison d'environ 95 %. Le palier est atteint pour une concentration de MIP-S1P 1 de l'ordre de 0,4 mg/mL.

Par rapport aux résultats que l'on a obtenus précédemment et qui tendaient à démontrer que les liaisons observées pour le MIP-S1P 1 dépendaient majoritairement de l'interaction de la molécule cible avec le monomère fonctionnel, ce résultat n'est pas surprenant. Du fait des différences importantes dans la structure du C1P TopFluor® (deux chaînes carbonées et un groupement fluorescent) ce résultat semble bien confirmer que les empreintes moléculaires ne sont pas totalement formées et qu'elles ne sont pas suffisamment spécifiques de la S1P ou bien qu'elles ne sont pas accessibles voire inexistantes. Avec un MIP-S1P aussi peu sélectif, il sera probablement impossible de reconnaître spécifiquement la S1P libre dans le plasma sanguin. Nous avons donc cherché à augmenter la sélectivité du MIP-S1P et nous avons pour cela suivi trois stratégies indépendantes dont le but était d'améliorer le processus de formation des empreintes et de favoriser les interactions spécifiques au cours du test de liaison.

2.3.2.2 Optimisation de la sélectivité du MIP par différentes stratégies

2.3.2.2.1 Optimisation de la sélectivité par l'utilisation d'un nouveau monomère fonctionnel

Nous avons vu précédemment que la sélectivité repose sur l'efficacité du processus de la formation des empreintes moléculaires qui dépend surtout de la solubilisation de la molécule *template* dans la solution de pré-polymérisation et de la stabilité du complexe *template*/monomère fonctionnel. La solubilisation de la molécule *template* est directement liée au choix du solvant de polymérisation tandis que la stabilité du complexe *template*/monomère fonctionnel est fonction de la force d'interaction existante entre les deux molécules. Or, nous avons montré précédemment par des analyses RMN que la force d'interaction en question était très faible dans le cas du monomère AB acétate et la question d'un éventuel problème posé par la présence en excès de triéthylamine dans la solution de polymérisation reste d'actualité, même si les résultats du MIP-S1P 1 optimisé semblent prouver le contraire. Nous avons alors entrepris de remplacer le monomère AB acétate par un nouveau monomère fonctionnel et d'améliorer les conditions de solubilisation de la molécule *template*. Dans nos recherches d'un nouveau monomère fonctionnel, nous avons identifié le monomère basique N,N-diéthylaminoéthyl méthacrylate (DEAEM) capable de former des liaisons acide/base avec les groupements phosphates acides et présentant l'intérêt supplémentaire de pouvoir probablement remplacer la triéthylamine dans son rôle d'aide à la solubilisation.

Avant d'utiliser le DEAEM pour la préparation d'un MIP nous avons cherché à évaluer les interactions probables entre la molécule *template* et ce monomère fonctionnel.

Pour cela, des études de spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été utilisées. Pour des raisons économiques nous avons décidé comme précédemment de réaliser ces tests de RMN à l'aide de l'OPA. Les analyses RMN ont été effectuées dans du méthanol deutéré seul et les variations du déplacement chimique de l'atome de phosphore (^{31}P) ont été suivies. Les résultats des tests de RMN sont présentés dans la figure 2.21.

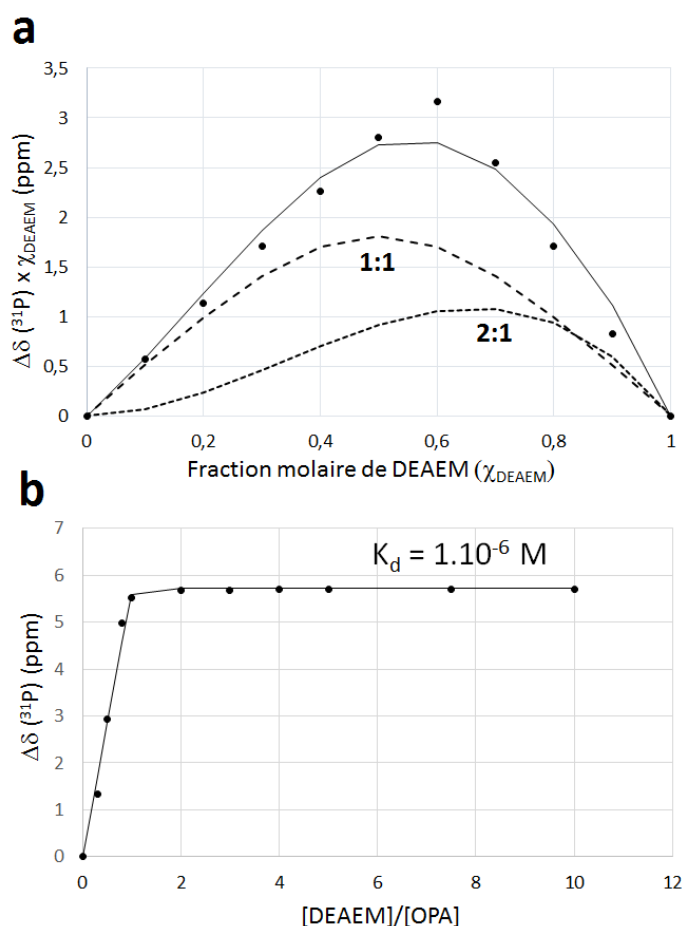


Figure 2.21 : Résultats des tests RMN - a) Courbe de Job. Les points correspondent aux valeurs expérimentales, les traits en pointillés aux composantes du modèle d'ajustement pour les stœchiométries 1:1 et 2:1 et le trait plein à l'ajustement des données expérimentales obtenu par la somme des deux composantes. **b) Courbe de titrage.** Les points correspondent aux valeurs expérimentales et le trait plein à l'ajustement des données.

Nous constatons que la variation du déplacement chimique ($\Delta\delta$) de l'atome de phosphore (^{31}P) du groupe phosphonate du OPA en fonction de la fraction molaire de DEAEM est importante (3,5 ppm pour la valeur maximale) ce qui traduit une interaction forte. La composante de stœchiométrie 1 : 1 semble prédominer ce qui suggère une interaction d'une molécule de OPA pour une molécule de DEAEM dans le méthanol deutéré seul, bien que la composante 2 : 1 traduisant une interaction de deux molécules de OPA pour une molécule de DEAEM n'est pas négligeable. Le titrage permet d'estimer une constante de dissociation du complexe de stœchiométrie 1 : 1 environ égale à 1.10^{-6} M ce qui confirme la forte interaction. Il s'agit d'une valeur typique pour un MIP [123].

Le **MIP-OPA 2** a donc été synthétisé (voir figure 2.22) dans le méthanol seul et en ajoutant une quantité molaire de **DEAEM** doublée par rapport à l'OPA.

Polymère	Molécule <i>Template</i>	Monomères fonctionnels	Agent réticulant	Initiateur	Solvant
MIP-OPA 2	OPA (0,05 mmol)	DEAEM (0,1 mmol)	EDMA (1 mmol)	ABDV (0,0205 mmol)	Méthanol (4000 µL)

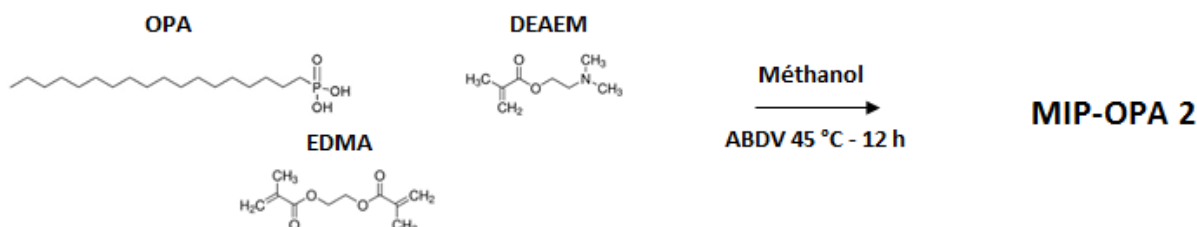


Figure 2.22 : Formulation et voie de polymérisation du MIP-OPA 2.

Afin d'évaluer les capacités de liaison et la sélectivité du MIP-OPA 2, nous avons réalisé un test de liaison avec du céramide 1-phosphate fluorescent (C1P TopFluor®) en tant que molécule cible et comparé les résultats obtenus avec ceux d'un test de liaison identique mais réalisé avec la S1P fluorescéine comme molécule cible. Les mesures des deux tests de liaison ont été effectuées par spectroscopie de fluorescence (spectrofluorimètre Fluorolog®) en utilisant le **C1P TopFluor®** et la **S1P fluorescéine** en tant que molécules cibles à une concentration de **500 nM dans le méthanol**. Les molécules cibles ont été exposées à des concentrations variables de **MIP-OPA 2 (de 0 à 1 mg/mL)** et les tests de liaison ont été réalisés dans le **méthanol seul**. Les résultats sont présentés dans la figure 2.23.

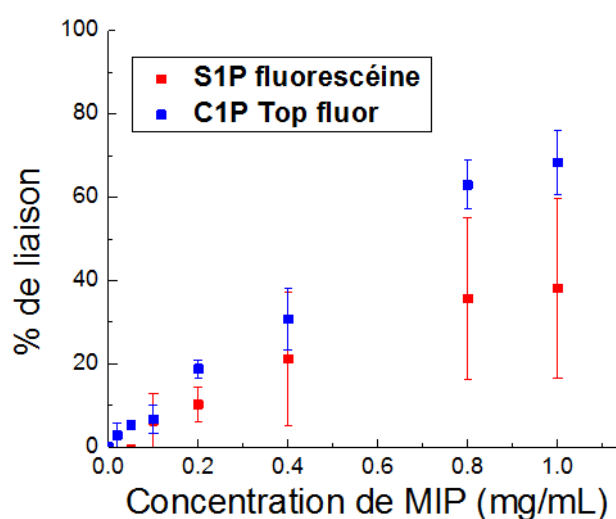


Figure 2.23 : Tests de liaison du MIP-OPA 2 pour le C1P Top fluor et la S1P fluorescéine dans le méthanol (N=3).

Nous constatons qu'une fois de plus les pourcentages de liaison augmentent progressivement avec la concentration de MIP-OPA 2. Cette fois-ci, le palier ne semble pas atteint et les résultats du C1P TopFluor® sont différents de ceux de la S1P fluorescéine. Le pourcentage de liaison maximale pour le C1P TopFluor® est proche de 70 % alors que celui de la S1P fluorescéine est d'environ 40 %.

Le fait que le palier ne soit pas atteint pour la même gamme de polymère que celle utilisée dans le test de liaison du MIP-S1P 1 pourrait traduire le fait que la cinétique d'interaction avec ce monomère ou bien la répartition des sites spécifiques dans la matrice polymérique sont différentes.

Bien que les barres d'erreurs soient importantes, la différence de liaison de C1P TopFluor® et de S1P fluorescéine pourrait bien être significative. Malheureusement, le MIP-OPA 2 semble reconnaître de manière plus spécifique le C1P TopFluor® plutôt que la S1P fluorescéine. Il aurait été intéressant de continuer à augmenter la concentration de MIP-OPA 2 pour voir à partir de quand le palier est atteint et si la tendance observée se maintient. Compte tenu du résultat, nous n'avons pas synthétisé de MIP-S1P avec le monomère DEAEM.

2.3.2.2 Optimisation de la sélectivité par la combinaison de plusieurs monomères fonctionnels

Une autre voie pour augmenter la stabilité du complexe molécule *template*/monomère fonctionnel et donc la sélectivité du MIP consiste à combiner lors de l'étape de polymérisation différents monomères fonctionnel pour cibler différentes régions de la molécule *template* et d'augmenter ainsi la fidélité des empreintes [76].

Dans le but de cibler la chaîne carbonée hydrophobe de la S1P nous avons décidé d'utiliser des monomères hydrophobes. Deux monomères fonctionnels hydrophobes ont été identifiés comme des candidats potentiels, il s'agit du N-décyl méthacrylate et du butyl méthacrylate (voir figure 2.24).

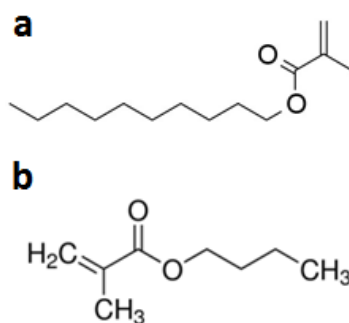


Figure 24 : Structures du N-décyl méthacrylate (a) et du butyl méthacrylate (b)

Les polymères MIP-S1P 2 et MIP-S1P 3 ont été préparés à partir de la formulation du MIP-S1P 1 mais en ajoutant d'abord l'un puis l'autre monomère fonctionnel en quantité stœchiométrique avec la molécule *template* (voir figure 2.25).

Polymère	Molécule <i>Template</i>	Monomères fonctionnels	Agent réticulant	Initiateur	Solvant
MIP-S1P 2	S1P (0,013 mmol)	AB acétate / N-déclyl méthacrylate (0,013/0,013 mmol)	EDMA (0,26 mmol)	ABDV (0,0053 mmol)	Méthanol (900 µL) Chloroforme (130 µL) Triéthylamine (90 µL)
MIP-S1P 3	S1P (0,013 mmol)	AB acétate / N-déclyl méthacrylate / Butyl méthacrylate (0,013/0,013/0,013 mmol)	EDMA (0,26 mmol)	ABDV (0,0053 mmol)	Méthanol (900 µL) Chloroforme (130 µL) Triéthylamine (90 µL)

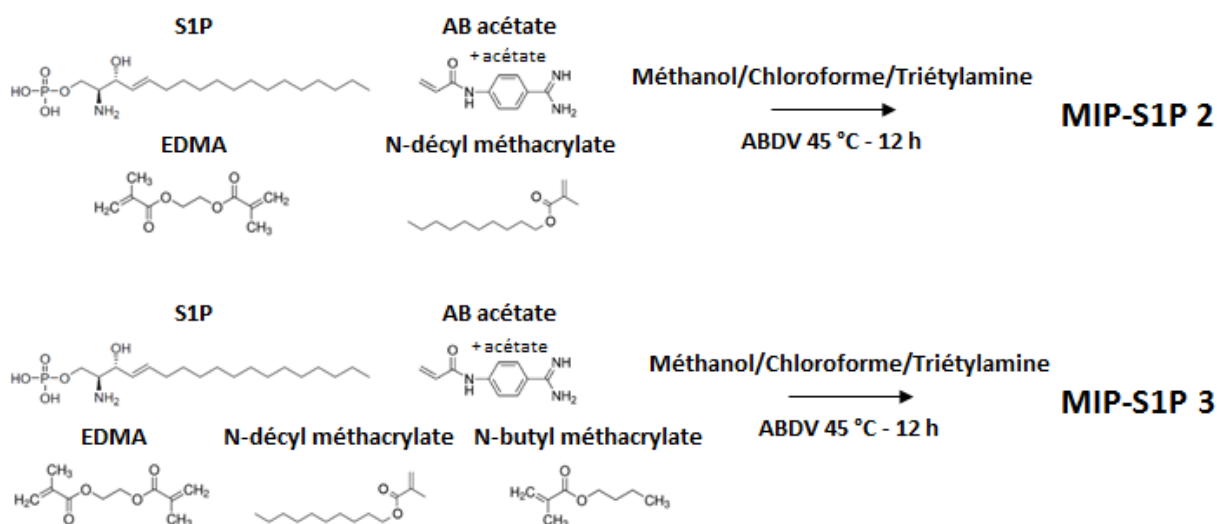


Figure 2.25 : Formulation et voie de polymérisation des MIP-S1P 2 et MIP-S1P 3.

Afin d'évaluer les capacités de liaison et la sélectivité du MIP-S1P 2 et du MIP-S1P 3, nous avons réalisé pour chacun des deux MIPs un test de liaison avec du céramide 1-phosphate fluorescent (C1P TopFluor®) en tant que molécule cible et comparé les résultats obtenus avec ceux un test de liaison identique mais réalisé avec la S1P fluorescéine comme molécule cible. Les tests de liaison ont été réalisés dans un mélange **méthanol/eau (1 : 1 V/V)** dans le but de stimuler les interactions hydrophobes. L'introduction de l'eau dans le méthanol a aussi eu pour conséquence d'augmenter le niveau d'intensité de fluorescence de la fluorescéine et nous avons pu effectuer des mesures de spectroscopie de fluorescence plus rapidement en utilisant le Varioskan® Flash. Le **C1P TopFluor®** et la **S1P fluorescéine** en tant que molécules cibles à une concentration de **500 nM** dans le mélange **méthanol/eau (1 : 1 V/V)** ont été

exposées à des concentrations variables de **MIP-S1P 2** et **MIP-S1P 3** (de 0 à 1 mg/mL). Les résultats des deux tests de liaison sont présentés dans la figure 2.26.

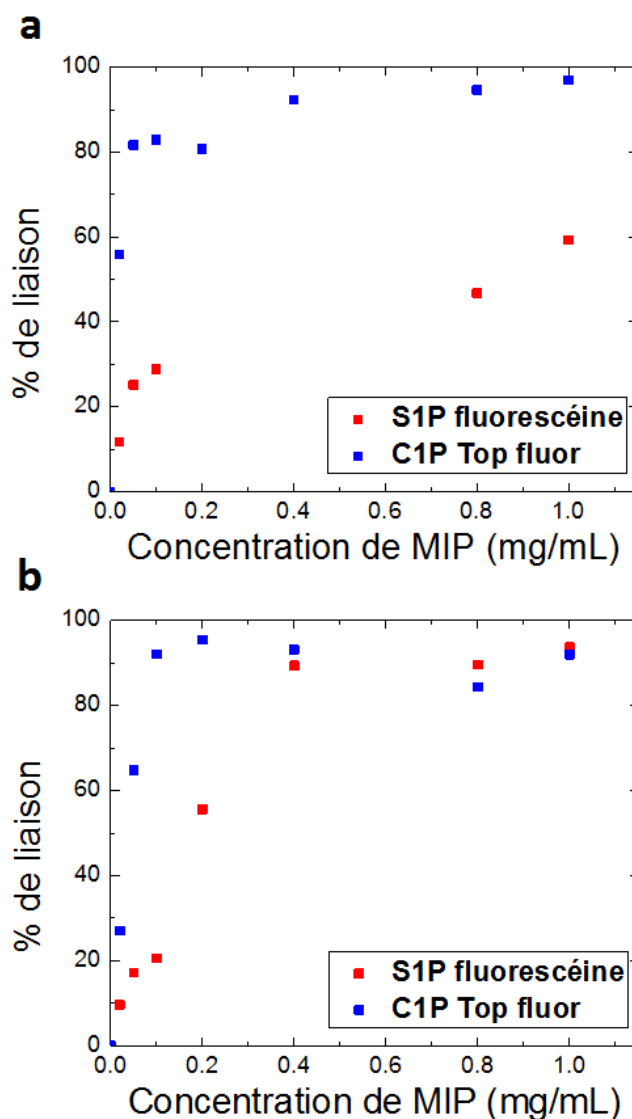


Figure 2.26 : Tests de liaison du MIP-S1P 2 (a) et du MIP-S1P 3 (b) pour le C1P Top fluor et la S1P fluorescéine dans le mélange méthanol/eau (N=1).

Nous voyons que dans les deux cas (figure 2.26 a et b) les pourcentages de liaison augmentent progressivement avec la concentration des MIP-S1P 2 et MIP-S1P 3.

Pour le MIP-S1P 2, la capacité de liaison maximale atteint une valeur d'environ 95 % pour le C1P TopFluor® et une valeur proche de 60 % pour la S1P fluorescéine. Pour cette dernière, le plateau de semble pas atteint. On constate donc que l'introduction du monomère hydrophobe N-décyl méthacrylate dans la formulation du MIP-S1P 1 a modifié les propriétés de liaison du

MIP pour la S1P fluorescéine en faisant baisser la capacité de liaison maximale. La cinétique de liaison semble être différente entre les deux molécules cible.

Pour le MIP-S1P 3, la capacité de liaison maximale atteint une valeur d'environ 90 % pour le C1P TopFluor® et la S1P fluorescéine mais la cinétique de liaison semble plus lente dans le cas de la S1P fluorescéine. La présence des deux monomères hydrophobes ne semble en aucun cas améliorer la sélectivité du MIP. Il est étrange de constater que l'ajout du monomère butyl méthacrylate à la formulation contenant déjà le monomère AB acétate et le premier monomère hydrophobe conduise à retrouver une liaison maximale proche de 90 %. Il serait nécessaire de répéter plusieurs fois ces expériences afin de pouvoir en tirer une conclusion plus claire mais globalement, il semblerait que l'ajout d'un ou des deux monomères hydrophobes à la formulation du MIP-S1P 1 ne soit pas la bonne méthode pour augmenter sa sélectivité. L'ajout de monomères hydrophobes supplémentaires n'aurait pas eu de sens sachant que le cumul d'un nombre trop important de monomères fonctionnels peut être contre-productif en ce qui concerne la sélectivité du MIP [76].

2.3.2.2.3 Optimisation de la sélectivité par la modification du solvant du test de liaison

La dernière méthode que l'on a employée pour tenter d'améliorer la sélectivité du MIP-S1P 1 a consisté à modifier le solvant de test de liaison de manière à favoriser les interactions spécifiques entre la molécule cible et les monomères fonctionnels par rapport à de possibles interactions non spécifiques. Sachant que le monomère AB acétate peut lier les groupes phosphates par des interactions électrostatiques, nous avons essayé de réaliser le test de liaison du MIP-S1P 1 dans un mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V) en espérant que l'augmentation de la polarité du milieu favorisera les interactions électrostatiques et donc les interactions spécifiques par rapport à des interactions non spécifiques potentielles, conduisant à une meilleure sélectivité.

Afin d'évaluer les propriétés de liaison et la sélectivité du MIP-S1P 1 dans ces nouvelles conditions, le test de liaison a été réalisé avec le **C1P TopFluor®** et avec la **S1P fluorescéine** en tant que molécules cibles à une concentration de **500 nM** dans le mélange **méthanol/eau (1 : 1 V/V)**. Les molécules cibles ont été exposées à des concentrations variables de **MIP-S1P 1 (de 0 à 1 mg/mL)**. Les résultats du test de liaison sont présentés dans la figure 2.27.

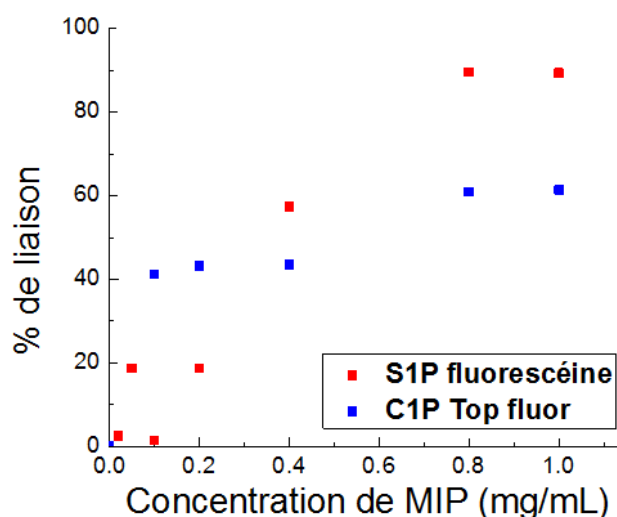


Figure 2.27 : Tests de liaison du MIP-S1P 1 pour le C1P Top fluor et la S1P fluorescéine dans le mélange méthanol/eau (N=1).

Nous observons cette fois une meilleure tendance. Les pourcentages de liaison augmentent progressivement avec la concentration de MIP-S1P 1 pour la C1P TopFluor® et pour la S1P fluorescéine. Pour la première fois, la capacité maximale de liaison est plus importante pour la S1P fluorescéine (90 %) par rapport au C1P TopFluor® (60 %). Il faudrait répéter l'expérience plusieurs fois avant d'en tirer une conclusion, mais il se pourrait que grâce à l'ajout d'un volume d'eau dans la solution du test de liaison les interactions spécifiques prennent le dessus sur les interactions non spécifiques.

2.4 Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre nous avons synthétisé un MIP-S1P à base de monomère AB acétate capable de lier la S1P fluorescéine dans le méthanol ou le mélange méthanol/eau (1 : 1 V/V) avec une valeur de capacité de liaison maximale de 90 %. Cette capacité de liaison importante semble uniquement liée aux interactions de la molécule cible avec le monomère AB acétate et non à une reconnaissance de forme et de taille de la molécule par des empreintes moléculaire. En effet, la présence du groupement fluorescent sur la S1P fluorescéine ne l'empêche pas de se lier à un MIP-S1P pourtant préparé avec la S1P non fluorescente. De plus, les résultats aux tests de liaison obtenus pour le NIP sont similaires. La conséquence est que le MIP-S1P n'est pas suffisamment spécifique de la S1P comme nous l'avons montré dans un test de sélectivité. Le MIP est par exemple capable de lier le C1P TopFluor® un analogue fluorescent de la S1P qui possède pourtant une différence majeure dans sa structure, à savoir la présence de non pas eu mais deux chaînes carbonées. Cette sélectivité n'est pas suffisante dans le but de quantifier spécifiquement la S1P dans le plasma sanguin et les molécules contenant au minimum un groupe phosphates ou phosphonate devraient aussi être reconnues. Le remplacement du monomère AB acétate par le monomère basique DEAEM qui a l'avantage de rendre plus facile

la solubilisation de la molécule *template* n'a pas suffi à augmenter la sélectivité, tout comme l'ajout cumulé de monomères hydrophobe dans la formulation du MIP. L'introduction d'un volume d'eau dans le méthanol au moment du test de liaison a permis d'améliorer partiellement la sélectivité, néanmoins ce résultat reste à confirmer, et des nouvelles expériences devront être menées pour s'assurer que les liaisons observées sont bien spécifiques.

Comme perspectives, il sera intéressant de tester la sélectivité du MIP avec d'autres analogues structuraux de la S1P et de réaliser les tests de liaison dans un milieu aqueux puis directement dans le plasma sanguin. Il serait mieux de réaliser les mesures par un moyen sans marquage (LC-MS par exemple) pour que les interactions ne soient pas perturbées par la présence d'un groupe fluorescent ou que ce dernier conduise à des interactions non spécifiques.

Chapitre 3 Méthodes de photopolymérisation d'un MIP en surface pour le développement d'un capteur permettant la quantification de la S1P dans un fluide biologique

3.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les avantages des MIPs en font des matériaux de choix pour remplacer les molécules biologiques en tant que couche sensible dans les biocapteurs [128]–[130]. Si les techniques de polymérisation classiques, telle que la polymérisation en masse, employée dans le chapitre 2, restent les plus simples à mettre en œuvre et donc les plus utilisées, elles ne sont pas les plus adaptées au couplage du MIP avec le transducteur d'un capteur. Depuis une trentaine d'années, des méthodes de polymérisation alternatives se sont développées et ont abouti à la préparation de MIPs de différentes formes (billes, membranes, couches) et à leur utilisation dans la préparation de capteurs [93], [101]. Une des étapes clés dans le développement d'un capteur à base de MIP est de trouver le moyen approprié d'associer le polymère avec le transducteur. Le MIP peut être synthétisé *in situ* à la surface du transducteur ou alors celle-ci peut être recouverte d'un MIP préformé. La polymérisation *in situ* peut être réalisée par ou suite à des techniques de dépôt classiques, comme par exemple le « *spin coating* », le « *spray coating* » ou le « *dip coating* » qui permettent entre autre d'appliquer des films d'épaisseur contrôlée de solution de pré-polymérisation à la surface du transducteur [98], [131], [132]. Dans le cas de la polymérisation radicalaire, les dépôts doivent être réalisés sous atmosphère privée d'oxygène afin d'éviter l'effet de piégeage des radicaux, inhibiteur de polymérisation. Un moyen très simple d'y parvenir consiste à emprisonner la solution de pré-polymérisation entre deux surfaces plates, par exemple celle du transducteur et celle d'une lamelle de microscope en verre puis d'initier la polymérisation [57], [133], [134].

Dans cette partie, nous avons souhaité polymériser un MIP à la surface d'une fibre optique (ou fil de verre) dans l'idée de réaliser la quantification de la S1P directement au sein d'un fluide biologique par des mesures de spectroscopie infrarouge par onde évanescente. Le dispositif expérimental que nous avons envisagé est représenté sur la figure 3.1. Cette technique de mesure couramment appelée FEWS, de l'anglais *Fiber Evanescent Wave Spectroscopy* est basée sur le principe de la réflexion totale atténuée des rayons infrarouges sur les parois internes de la fibre optique qui donne naissance à une onde évanescente capable de s'échapper de quelques micromètres hors de la fibre et d'interagir avec un échantillon. Elle

présente l'avantage de pouvoir déporter le signal infrarouge d'un spectromètre vers le lieu de l'analyse permettant ainsi des analyses in-situ et en temps réel [135], [136]. Dans cet objectif, plusieurs étapes ont été réalisées.

Dans un premier temps, la formulation du MIP-S1P 1 décrite dans le chapitre 2 a été optimisée de façon à le rendre photosensible et une méthode de photopolymérisation à la surface d'échantillons de silicium a été développée. Le couplage de cette méthode de polymérisation à une technique de photolithographie a permis de structurer le MIP-S1P en motifs afin de le valider par des mesures de microscopie de fluorescence. En parallèle, le MIP-S1P a pu être photopolymérisé sous forme de couches minces à la surface d'un capteur de Microbalance à Cristal de Quartz (QCM) pour permettre sa validation par une méthode sans marquage.

Dans un second temps, nous avons exploré l'utilisation d'une fibre optique recouverte d'une couche de MIP-S1P dans le but de quantifier la S1P dans un fluide biologique par des mesures de spectroscopie infrarouge par onde évanescente à la surface de la fibre. Des résultats préliminaires sont présentés dans la dernière partie.

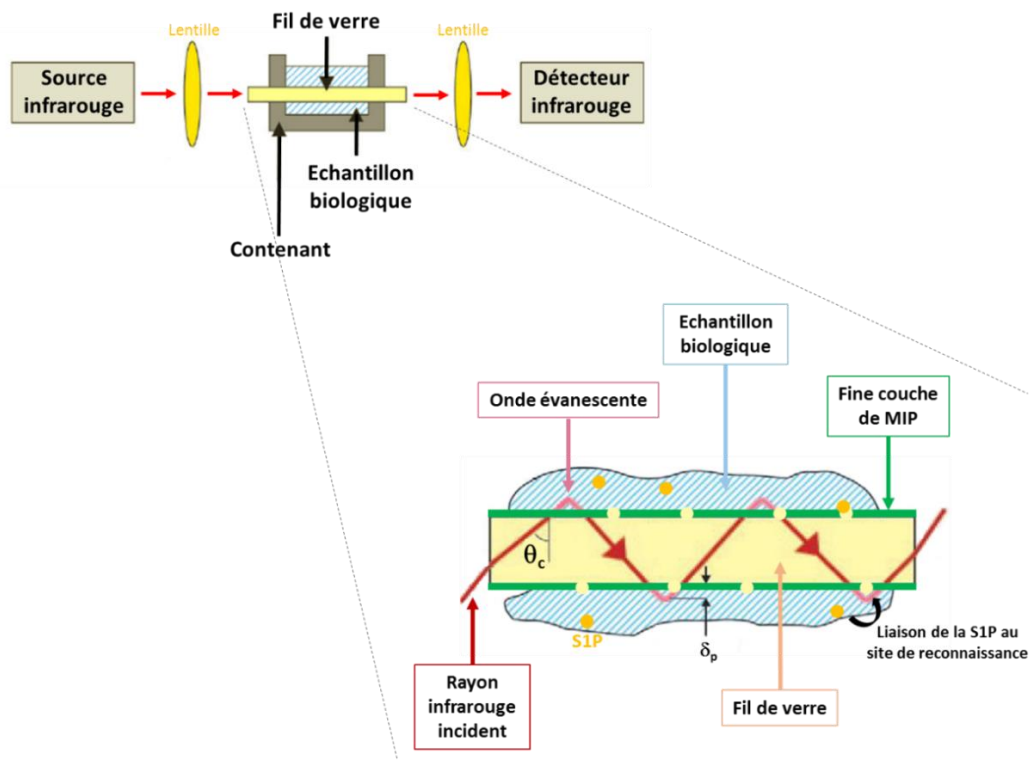


Figure 3.1 : Représentation schématique du capteur envisagé.

3.2 Méthode de photopolymérisation du MIP en surface et validation par des techniques avec et sans marquage

Contrairement aux autres modes de polymérisation (thermique, électrochimique, etc.) la photopolymérisation a pour avantages de présenter un temps de réaction très rapide et de pouvoir être employée à température ambiante et même en dessous. Or, il a déjà été démontré que lorsque la polymérisation se fait à basse température, la formation du complexe molécule *template*/monomère fonctionnel par des interactions non covalentes est plus efficace, conduisant à de meilleures capacités de liaison. D'autres avantages de la polymérisation par la lumière sont que de nombreuses formes de MIPs différentes sont accessibles et qu'elle permet un contrôle spatial précis de la zone d'irradiation ainsi que des cinétiques de polymérisation. Ainsi, des MIPs sous la forme de fines couches ou de motifs variés ont pu être photostructurés à la surface de nombreux transducteurs, grâce à l'utilisation de méthodes optiques classiques ou plus originales (photolithographie, polymérisation à faisceau laser focalisé, lithographie optique assistée par champs proche, etc.), y compris à l'échelle micro et nanométrique [82], [137]–[142]. Si l'on ajoute à cela que de nombreux photoinitiateurs sont commercialement disponibles [138], on ne s'étonnera pas du succès que rencontre la photopolymérisation dans le contexte du développement de capteurs.

Dans cette partie nous présentons une méthode de photopolymérisation du MIP-S1P dont la formulation, mise au point dans le chapitre précédent, a préalablement été rendu photosensible par l'ajout d'un photoinitiateur commercial.

Dans un premier temps, le MIP-S1P a été structuré par photolithographie en motifs millimétriques sur des échantillons en silicium afin de le valider par des mesures de microscopie de fluorescence. L'homogénéité des dépôts de MIP a été évaluée par microscopie optique.

Dans un second temps, nous avons souhaité réaliser la validation du MIP-S1P par une méthode sans marquage et c'est la raison pour laquelle nous l'avons photopolymérisé à la surface de capteurs de QCM. La couche de MIP a été caractérisée par des mesures de hauteur en Microscopie à Force Atomique (AFM).

Enfin, afin d'améliorer l'homogénéité de la couche de MIP et de pouvoir contrôler finement son épaisseur des méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée (CRP) ont été utilisées.

3.2.1 Matériels et méthodes

3.2.1.1 Réactifs et matériels

Tous les produits chimiques et les solvants utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich® sauf ceux mentionnés ci-dessous. La sphingosine 1-phosphate (S1P) et la sphingosine 1-phosphate fluorescéine (S1P fluorescéine) ont été commandées chez Echelon®. Nous avons synthétisé le monomère fonctionnel (4-acrylamidophenyl)(amino)méthaniminium acétate (AB) selon la

procédure décrite dans l'article de Nestora S. *et al.*, [111] et rappelée dans le chapitre 2. L'initiateur de polymérisation irgacure® 2959 provient de chez Cyba® Specialty Chemical Inc. Les structures des différents composés chimiques utilisées dans ce chapitre sont représentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Structure chimique des différents composés utilisés dans ce chapitre.

Composé	Utilisation	Structure
S1P	Template Molécule cible	
AB	Monomère fonctionnel	
EDMA	Agent réticulant	
Irgacure® 2959	Photoinitiateur	
Méthanol	Solvant de polymérisation	
Chloroforme	Solvant de polymérisation	
Triéthylamine	Solvant de polymérisation	
MAPTMS	Organosilane	
FTDS	Organosilane	
S1P fluorescéine	Molécule cible fluorescente	
Fluorescéine	Molécule cible de contrôle	

3.2.1.2 Formulation du polymère à empreintes moléculaires

La formulation du MIP-S1P synthétisé dans ce chapitre est la même que celle du MIP-S1P 1 présentée dans le chapitre 2, seul l'initiateur a été modifié. La formulation est rappelée dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Formulation détaillée du MIP-S1P préparé dans ce chapitre.

Polymère	Molécule <i>Template</i>	Monomères fonctionnels	Agent réticulant	Initiateur	Solvant
MIP-S1P 1	S1P (0,013 mmol)	AB acétate (0,013 mmol)	EDMA (0,26 mmol)	Irgacure® 2959 (0,0053 mmol)	Méthanol (900 µL) Chloroforme (130 µL) Triéthylamine (90 µL)

3.2.1.3 Méthode de polymérisation

3.2.1.3.1 Préparation de la solution de pré-polymérisation

La solution de pré-polymérisation a été préparée en mélangeant la molécule *template*, le monomère fonctionnel, l'agent réticulant et l'initiateur dans un solvant de polymérisation. Les choix du type et de la quantité du photoinitiateur ont fait l'objet d'une optimisation. Dans un tube en verre (4 mL) muni d'un bouchon avec septum, la molécule *template* et le monomère fonctionnel ont d'abord été solubilisés dans le solvant de polymérisation et la solution a été vortexée pendant 10 minutes et soniquée pendant 2 minutes. Dix minutes après, l'agent réticulant a été ajouté et la solution a été vortexée pendant 30 secondes. En suivant, l'initiateur a été introduit et la solution de pré-polymérisation a de nouveau été vortexée pendant 30 secondes. Enfin, l'oxygène, qui est un inhibiteur de polymérisation, a été évacué du tube à l'aide d'un flux d'azote (1minute/1mL). Cette opération a été effectuée sur glace afin de limiter l'évaporation du solvant lors de l'application du flux d'azote. Le tube a été fermé de façon étanche et conservé au réfrigérateur (4 °C).

3.2.1.3.2 Méthode de photopolymérisation en surface

Une seule et même méthode de photopolymérisation a été employée pour polymériser le MIP sur des échantillons en silicium et sur des capteurs de QCM. Pour plus de clarté, dans la suite de l'exposé, le terme « substrats » sera utilisé pour désigner les échantillons en silicium et les capteurs de QCM.

Dans le cas des échantillons en silicium, la méthode de polymérisation a été couplée à une technique de photolithographie permettant de structurer le MIP en motifs millimétriques et de faciliter sa future validation par microscopie de fluorescence. Dans le cas des capteurs de QCM, la photopolymérisation a été effectuée sur l'ensemble de la surface (polymérisation « pleine plaque »), sans employer de technique de photolithographie.

3.2.1.3.2.1 Préparation des substrats

Des échantillons en silicium (15 mm x 15 mm) ont été préalablement découpés dans un wafer standard en silicium de diamètre 100 mm, d'orientation (100), de type P (10^{15} atomes/cm³) et d'épaisseur 500 µm. Les capteurs de QCM de diamètre 14 mm, d'épaisseur 0,3 mm, de coupe AT, de fréquence propre de résonnance environ égale à 4,95 MHz +/- 50 kHz et munis d'une électrode recouverte d'une couche de silicium d'épaisseur comprise entre 40 nm et 1 µm ont été commandés chez Biolin Scientific (Q-Sense). Pour permettre l'accroche covalente du polymère à la surface des substrats, nous avons réalisé une silanisation de surface en utilisant le 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (MAPTMS). Cet organosilane est immobilisé sur la surface via la formation de liaisons covalentes O-Si-O entre les groupements méthoxy (OCH₃) présents à l'une de ses extrémités et les groupements hydroxyles (OH) présents à la surface des substrats en silicium. La présence du groupe méthacrylate polymérisable à l'autre extrémité du MAPTMS permettra son accroche au polymère. Suite à un rinçage rapide dans l'acétone, l'éthanol puis l'eau, les substrats ont été immergés dans un bain piranha (H₂O₂:H₂SO₄, 1:1 v/v, 5 min), rincés à l'eau DI et séchés à l'azote avant une activation de surface par plasma oxygène (PVA TePla 300, 1000 ml/min (O₂), 800 W, 5 min) afin de les rendre plus hydrophiles et de former des groupements hydroxyles (OH) en surface. Pour les capteurs de QCM, l'étape du bain piranha a été écartée afin d'éviter leur détérioration. Les substrats ainsi activés ont été directement plongés dans une solution à 1 % en volume de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate dans du toluène anhydre, comportant 0,1 % en volume de triéthylamine déshydratée à l'hydroxyde de sodium. Après 12 heures d'incubation, ils ont été activement rincés dans des bains successifs de toluène, d'acétone et d'éthanol pendant 5 minutes sous ultra-sons, puis séchés sur une plaque chauffante à 150°C pendant 30 minutes.

3.2.1.3.2.2 Protocoles de photopolymérisation en surface

Les protocoles de photopolymérisation suivis pour les échantillons de silicium et pour les capteurs de QCM sont schématisés sur la figure 3.2 a.

Immédiatement après l'étape de silanisation, une goutte de solution de pré-polymérisation (dont le volume a été fixé à 10 µL après optimisation) a été déposée sur la surface des substrats et étalée grâce à la superposition d'une lamelle de verre de microscope (20 x 20 mm, épaisseur 0.13 mm). La lamelle de verre a aussi permis de limiter la contamination par l'oxygène au cours de la polymérisation.

Dans le cas des échantillons de silicium, un morceau de métal (15 x 15 mm, épaisseur 1 mm) percé de trous (huit trous de diamètre 1,5 mm) a été positionné par-dessus la lamelle de verre en tant que masque de photolithographie (voir figure 3.2 b). Le masque n'a pas été utilisé pour les capteurs de QCM. Suite à l'optimisation concernant le type de lampe, sa puissance et le temps d'insolation à utiliser, la polymérisation a finalement été effectuée par exposition aux ultraviolets (UVs) pendant 10 minutes (Lampe UV Fisher Bioblock Scientific, 230V AC 50 - Vilber T6-L : 365nm, 6W). Après polymérisation, les échantillons ont été immergés dans deux bains

successifs d'acétone et d'éthanol pendant 2 minutes afin de retirer la lamelle de verre et de dissoudre les parties non polymérisées. Dans le but de faciliter le retrait de la lamelle de verre, une monocouche auto-assemblée (SAM de l'anglais *Self-Assembled Monolayer*) de perfluorodecyltrichlorosilane (FTDS), un organosilane, a été préalablement greffée à sa surface en phase gazeuse, ce qui permet de la rendre hydrophobe et antiadhésive vis-à-vis du polymère.

Dans le cas des échantillons de silicium, la solution de pré-polymérisation se comporte comme une résine de polarité négative et polymérise au niveau des ouvertures du masque. A la fin du protocole de polymérisation huit spots de polymère d'un diamètre d'environ 1.5 mm sont obtenus (voir figure 3.2 c).

Pour les capteurs de QCM, la solution polymérise sur l'ensemble de la surface exposée aux UVs (voir figure 3.2 d).

Les mêmes étapes ont été reproduites avec la solution de pré-polymérisation du NIP. Cependant, pour des raisons encore indéterminées, aucune polymérisation du NIP à la surface des substrats n'a pu être obtenue.

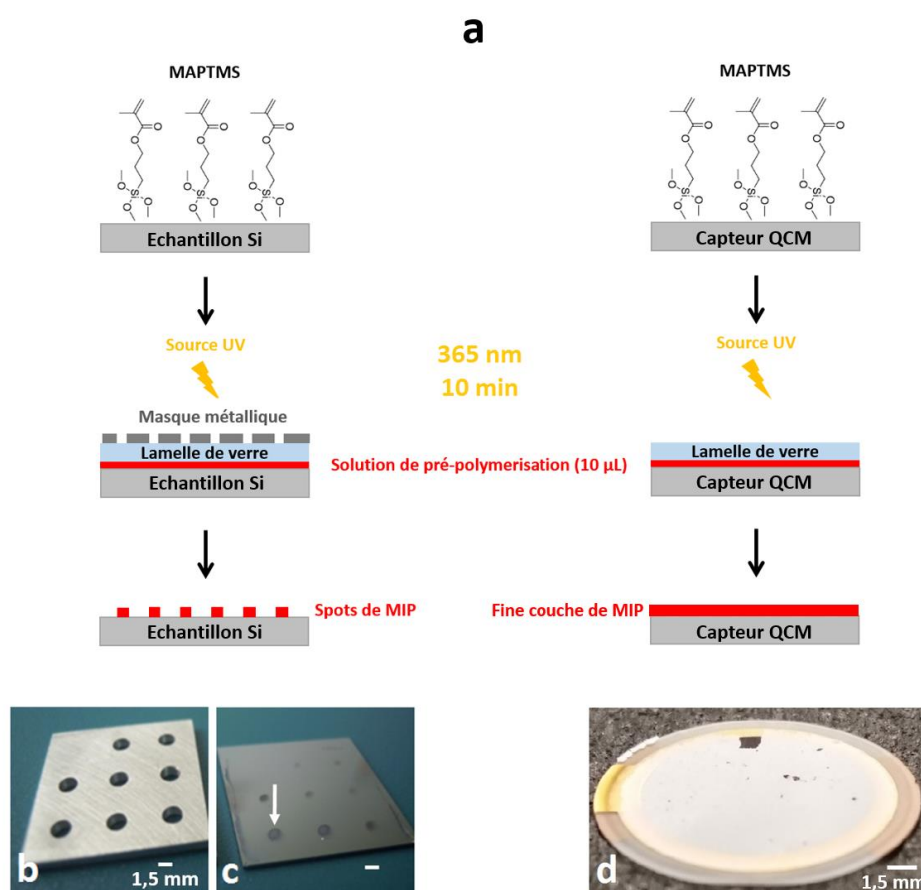


Figure 3.2 : a) *Etapes du processus de polymérisation. Etape 1 : Silanisation au MAPTMS de l'échantillon de silicium. Etape 2 : Polymérisation par photolithographie à travers un masque métallique percé de trous et une lamelle de verre d'une goutte de solution de pré-polymérisation. Etape 3 : Retrait du masque métallique, de la lamelle de verre et des parties non polymérisées pour l'obtention des spots de MIP. b) Photographie du masque métallique percé de trous. c) Photographie de l'échantillon de silicium et des spots de MIP (un spot est indiqué par la flèche). d) Photographie du capteur de QCM recouvert de la couche de MIP.*

3.2.1.3.3 Procédure d'extraction de la molécule *template*

Afin d'extraire la molécule *template* piégée dans les empreintes du MIP, les substrats ont été rincés dans des bains successifs de méthanol/acide acétique (9 : 1 V/V), de méthanol/ammoniac (100 mM), d'eau et de méthanol (3 x 1h pour chaque bain), puis séchés avec un flux d'azote.

3.2.1.4 Méthodes de caractérisation des dépôts de polymère à la surface des substrats

3.2.1.4.1 Echantillons de silicium

L'homogénéité des spots de MIP a été évaluée en microscopie optique avec un microscope Olympus BX51TF droit équipé d'une source de lumière blanche halogène, d'un objectif x5 (Olympus) et muni d'une caméra EMCCD (Andor). Les images ont été acquises via le logiciel Andor Solis et traitées avec le logiciel ImageJ.

3.2.1.4.2 Capteurs de QCM

Pour caractériser la morphologie de la couche de MIP déposée à la surface des capteurs de QCM nous avons réalisé des images de hauteur par Microscopie à Force Atomique (AFM de l'anglais *Atomic Force Microscopy*). L'AFM est un type de microscopie à sonde locale de très haute résolution. Elle permet d'analyser une surface point par point grâce à un balayage par une sonde constituée d'une pointe fine, ce qui permet de s'affranchir du problème de diffraction qui limite la résolution des microscopes optiques et d'imager sur une gamme allant de la dizaine de micromètre jusqu'au dixième de nanomètre. La micropointe, extrêmement fine (diamètre nanométrique) est positionnée à l'extrémité d'un microlevier flexible de constante de raideur connue. Le principe physique repose sur la mesure de l'interaction attractive ou répulsive entre les atomes de la pointe et les atomes à la surface de l'échantillon. Quand la pointe est proche de la surface, les forces d'interactions entre la pointe et l'échantillon entraînent une déviation du levier suivant la loi de Hooke.

L'analyse de la déviation du levier, réalisée via la mesure au niveau d'une photodiode quatre quadrants de la déflexion d'un spot laser issu de la réflexion d'un rayon laser à la surface du levier, permet de retracer le parcours exact de la pointe et d'imager la topographie de la surface.

Les mesures peuvent être réalisées en mode contact ou en mode *tapping*. Le mode *tapping* consiste à faire vibrer le microlevier à sa fréquence propre de résonance avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface, l'amplitude d'oscillation du levier varie. La mesure de cette variation permet d'accéder à la topographie. Un rétrocontrôle est effectué tout au long de la mesure via la déflexion du spot laser afin d'ajuster la hauteur de l'échantillon grâce à un tube piézoélectrique (voir figure 3.3).

Nous avons utilisé l'AFM Dimension Icon de Bruker Inc. en mode *tapping*. Les images ont été acquises avec le logiciel Icon et traitées avec le logiciel libre Gwiddion.

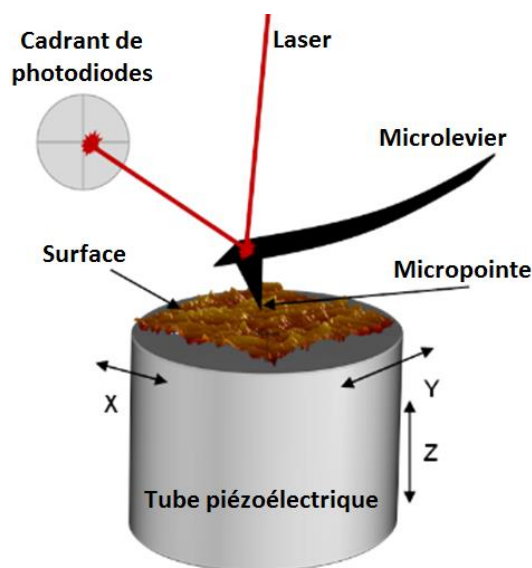


Figure 3.3 : Principe de la microscopie à force atomique (AFM).

3.2.1.5 Protocoles des tests de liaison

Afin d'évaluer la capacité de reconnaissance du MIP-S1P pour la S1P, des tests de liaison ont été menés à l'aide d'une technique de mesure avec marquage, la microscopie optique de fluorescence grâce aux échantillons en silicium et par l'utilisation d'une technique sans marquage, la Microbalance à Cristal de Quartz à l'aide des capteurs de QCM. Le protocole détaillé de chacun de ces tests de liaison est présenté dans les paragraphes suivants.

3.2.1.5.1 Test de liaison par microscopie optique de fluorescence

Pour ce test de liaison la S1P fluorescéine a été employée en tant que molécule cible.

Un échantillon en silicium avec les spots de MIP a été immergé dans une solution contenant de la S1P fluorescéine à $1,3 \mu\text{M}$ dans du méthanol pendant 12h, rincé brièvement avec de l'acétone et de l'éthanol pour éliminer les liaisons non spécifiques, avant de subir une nouvelle procédure d'extraction. Ce cycle de trois étapes a été répété deux fois pour un seul et même échantillon.

Après chaque étape des deux cycles, des images de microscopie optique de fluorescence de chaque spot de MIP ont été obtenues avec un microscope Olympus BX51TF droit équipé d'une Lampe à vapeur de mercure X-cite série 120 Q, d'un objectif x10 (Olympus), d'un cube-filtre de longueurs d'onde (ex : 370 nm/ em : 470 nm) et muni d'une caméra EMCCD (Andor).

Les images brutes au format Andor ont été converties au format TIFF (16 bits en niveaux de gris) et la quantification de l'intensité moyenne de fluorescence de chaque spot puis de l'intensité moyenne de l'échantillon ont été réalisés avec le logiciel ImageJ.

En parallèle, les mêmes cycles ont été reproduits avec un autre échantillon semblable mais en remplaçant la S1P fluorescéine par de la fluorescéine seule à la même concentration (1,3 μM) et dans le même solvant en tant contrôle.

3.2.1.5.2 Test de liaison par Microbalance à Cristal de Quartz

3.2.1.5.2.1 Présentation de la Microbalance à Cristal de Quartz

3.2.1.5.2.1.1 Principe de mesure

La Microbalance à Cristal de Quartz (QCM de l'anglais *Quartz Crystal Microbalance*) est un outil de détection sans marquage très sensible permettant la mesure en temps réel de très faibles variations de masse (de l'ordre de 10 pg/cm^2).

Le principe de mesure est basé sur les propriétés piézo-électriques d'une lame de quartz placée entre deux électrodes. Lorsqu'on lui applique un champ électrique (\vec{E}) convenablement orienté, la lame de quartz subit une déformation élastique. Le mode de vibration en cisaillement d'épaisseur est le plus souvent employé. Si le champ électrique appliqué est alternatif et fixé à une fréquence appropriée (qui dépend de la géométrie et des propriétés intrinsèques du quartz), la lame de quartz se met à vibrer dans un mode de résonance mécanique. L'amplitude maximale de vibration (A_{max}) sera obtenue pour un champ électrique alternatif de fréquence f_0 appelée fréquence de résonance du quartz et qui dépend des propriétés du matériau (coupe, épaisseur, masse volumique, module d'élasticité, etc.). Lorsqu'une masse est ajoutée sur la surface du capteur, la fréquence de résonance change et cette variation est liée à la variation de masse.

Plus précisément la mesure s'effectue en trois étapes. En premier lieu, une source d'excitation extérieure (pulse) permet de mettre le résonateur en oscillations. L'excitation externe est alors supprimée et le système, écarté de son état d'équilibre va tenter d'y retourner à travers une série d'oscillations propre (ou libres) à la fréquence propre (ou de résonance) du système. A cause de l'amortissement, la décroissance de l'amplitude de vibration du résonateur est exponentielle. Plusieurs centaines de pics d'excitation par seconde sont ainsi effectués. Enfin, les valeurs de la fréquence de résonance f_0 et de la dissipation D (qui traduit l'amortissement) peuvent être déduites de cette décroissance.

3.2.1.5.2.1.2 Mise en équation du phénomène et modèles physiques

La mise en résonance du quartz est due à la génération dans le matériau d'ondes mécaniques stationnaires (superposition de deux ondes mécaniques progressives de même fréquence se déplaçant en sens inverse qui interfèrent constructivement). Ce phénomène se produit

lorsque l'épaisseur du quartz soumis à des oscillations devient égale à un multiple impair de la demi-longueur d'onde induite par l'excitation, d'où on écrit :

$$f = n \frac{v_q}{2e_q} = n f_0 \quad (1)$$

où f est une fréquence de vibration harmonique, n un nombre impair correspondant au nombre de mode ($n=1$ pour le mode fondamental, $n=3$ pour l'harmonique 3, etc.), v_q la vitesse de propagation du son dans le quartz (≈ 3340 m/s), e_q l'épaisseur du quartz et f_0 la fréquence de résonance.

La masse du quartz par unité de surface m_q étant donnée par :

$$m_q = \rho_q e_q \quad (2)$$

où ρ_q est la densité volumique du quartz.

En insérant (1) dans (2) et en différentiant (1) on obtient :

$$df = - \frac{f}{m_q} \cdot dm_q \quad (3)$$

Finalement, connaissant la variation de la fréquence de résonance on peut remonter à la variation de masse à la surface du quartz en utilisant par exemple la relation établie par Sauerbrey :

$$\Delta f = - \frac{f}{e_q \rho_q} \Delta m = - n \frac{2f_0^2}{v_q \rho_q} \Delta m = - n \frac{1}{C} \Delta m \quad (4)$$

où n est le nombre de mode, connu, et C une constante égale à $17,7 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{Hz})$ pour un quartz de coupe AT.

Cependant, il faut savoir que seule une variation de masse peut être déterminée et non pas la masse absolue d'analyte déposée à la surface du fait de la présence de molécules de solvant piégées à la surface qui participe à la variation de masse.

D'autre part, le modèle de Sauerbrey n'est applicable que dans le cadre de certaines limites de validité. Premièrement, le film de molécule adsorbé doit être suffisamment fin, de sorte que la variation de masse à mesurer soit inférieure à la masse de la lame de quartz. Deuxièmement, le film doit être rigidement adsorbé à la surface et de manière homogène pour qu'il puisse vibrer à la même fréquence que le quartz. En pratique, ces limites de validité reviennent à se placer dans le cas où l'amortissement est négligeable et elles se traduisent par un rapport $\Delta f / \Delta D < 20$ et/ou une convergence des harmoniques vers la même valeur ($\Delta f_{(n=1)} = \Delta f_{(n=3)} / 3 = \Delta f_{(n=5)} / 5 = \text{etc.}$). Si ces conditions de validité ne sont pas respectées, il conviendra de choisir un autre modèle plus complexe (Voigt, Maxwell, etc.).

En plus de la variation de la fréquence de résonance, la variation du facteur de dissipation D est aussi enregistrée lors d'une mesure. Ce facteur de dissipation est lié aux pertes d'énergie du système pendant un cycle complet de vibrations. Il correspond à l'inverse du facteur de qualité Q qui caractérise la largeur du pic de résonance et qui est égal au rapport entre la fréquence de résonance f_0 (pour laquelle l'amplitude des oscillations est maximale) et la bande passante Δf (c'est-à-dire la différence des fréquences de résonance à mi-hauteur du pic, là où l'amplitude des oscillations est égale l'amplitude maximale divisée par racine de deux). Le facteur de qualité traduit mathématiquement le rapport entre l'énergie totale stockée par le système et l'énergie dissipée par les oscillations.

La mesure du facteur de dissipation permet d'être renseigné sur d'autres propriétés de la couche déposée comme sa viscosité ou encore son élasticité.

$$D = \frac{1}{Q} \left(= \frac{\text{Energie dissipée par oscillation}}{2\pi \cdot \text{Energie totale stockée par le système}} \right) \quad (5)$$

Avec $Q = \frac{f_0}{\Delta f}$ et $\Delta f = f_2 - f_1$ tel que $A(f_2) = A(f_1) = \frac{A_{max}}{\sqrt{2}}$.

3.2.1.5.2.2 Protocole expérimental du test de liaison par QCM

Le système utilisé est le QCM-D Q-Sense E4. Il dispose de quatre chambres de réaction indépendantes qui permettent de réaliser des mesures sur quatre capteurs en parallèle, d'une pompe péristaltique de débit réglable qui rend possible les mesures en milieu liquide en mode statique et dynamique et d'un module d'électrochimie connecté à un ordinateur (voir figure 3.4). Le logiciel Qsoft permet l'acquisition des données et le choix des paramètres expérimentaux tandis que le logiciel QTools est utilisé pour l'analyse des données.

Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

L'une (expérience n°1) avait pour but de comparer la liaison de la S1P (solubilisée dans un mélange eau /BSA) à la surface d'un capteur de QCM recouvert de MIP-S1P par rapport à sa liaison sur un capteur de QCM vierge.

L'autre expérience (expérience n°2) avait pour objectif de comparer la variation de fréquence de résonance de deux capteurs de QCM recouvert du même MIP-S1P au passage d'une solution d'eau/BSA dans un cas et d'une solution de S1P (solubilisée dans un mélange eau /BSA). Les mêmes concentrations de BSA ont été utilisées dans ces deux cas. En partant des variations de fréquence de résonance au cours du temps attribuées à la liaison de la S1P sur le MIP, nous avons estimé la variation de masse en utilisant le modèle de Sauerbrey. Enfin, en exploitant les données de la variation de la dissipation au cours du temps nous avons analysé qualitativement les cinétiques de liaison et l'évolution de la rigidité de la couche déposée à la surface.

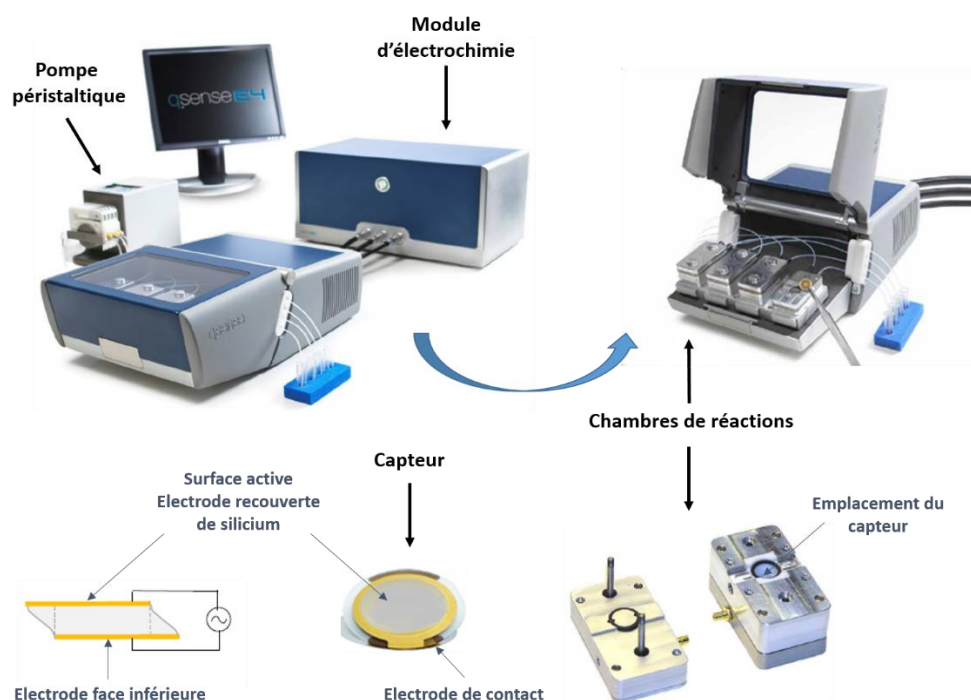


Figure 3.4 : Détails du système QCM-D utilisé.

▪ Expérience n°1 :

Deux capteurs de QCM, l'un vierge et l'autre recouvert de la couche de MIP-S1P ont été introduit dans les chambres de mesure.

Un test de mise en oscillation des quartz (en air puis dans l'eau) permet de s'assurer de leur viabilité par comparaison des fréquences de résonances obtenues pour chaque harmonique avec des valeurs de références. Le flux d'eau (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) a été maintenu jusqu'à la stabilisation de la variation de fréquence de résonance dans le temps. Chacun des flux imposés par la suite ont été maintenus jusqu'à la stabilisation de Δf dans le temps.

Les deux capteurs de QCM ont été exposés au passage d'un flux d'eau (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) contenant de la BSA (60 μM), puis à un flux d'eau (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) seule et enfin à un flux (30 $\mu\text{L}/\text{min}$) de S1P (3500 nM) dans une solution d'eau contenant de la BSA (60 μM). Après la stabilisation de Δf dans le temps, le flux a été stoppé pour une incubation en mode statique pendant 1h. Suite à la période d'incubation les capteurs ont été rincés à l'eau (300 $\mu\text{L}/\text{min}$) jusqu'à une nouvelle stabilisation de Δf dans le temps.

▪ Expérience n°2 :

Deux capteurs de QCM, tous deux recouverts d'une couche du même MIP-S1P ont été introduit dans les chambres de mesures. Le test de de viabilité a été effectué (en air puis dans l'eau) et le flux d'eau (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) maintenu jusqu'à la stabilisation de la variation de fréquence de résonance (Δf) dans le temps. Chacun des flux imposés par la suite ont été maintenus jusqu'à la stabilisation de Δf dans le temps.

L'un des capteurs a été exposé à un flux d'eau (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) contenant de la BSA (60 μM).

Parallèlement, l'autre capteur a été exposé à un flux (30 $\mu\text{L}/\text{min}$) de S1P (700 μM) dans une solution d'eau contenant de la BSA (60 μM).

Après la stabilisation de Δf dans le temps, les flux ont été stoppés pour une incubation en mode statique pendant 1h.

Suite à la période d'incubation les capteurs ont été rincés à l'eau (300 $\mu\text{L}/\text{min}$) jusqu'à une nouvelle stabilisation de Δf dans le temps.

3.2.1.6 Préparation des solutions lipidiques

Les solutions de S1P et de S1P fluorescéine ont été préparées à partir des composés sous forme de poudre dans des tubes en verre et les solutions mères ainsi que les aliquots ont été conservés à l'obscurité au congélateur (-20 °C) pendant moins de 3 mois.

3.2.1.6.1 Solutions de S1P

3.2.1.6.1.1 Dans le méthanol

La limite de solubilisation de la S1P dans le méthanol est de 0.3 mg/mL [113]. Pour solubiliser la poudre de S1P dans le méthanol, nous avons alternativement vortexé pendant 2 minutes puis soniqué dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes jusqu'à obtenir une solution claire. Des sous-dilutions ont été réalisées pour la préparation d'aliquots.

3.2.1.6.1.2 Dans une solution eau/albumine de sérum bovin (BSA)

Comme décrit dans le chapitre 1, la S1P se lie naturellement à l'albumine pour être transportée dans le plasma sanguin [45]. L'utilisation d'albumine de sérum bovin (BSA, de l'anglais *Bovine Serum Albumine*) permet la solubilisation de la S1P dans l'eau. Nous avons utilisé de la BSA *fatty-acid free*, c'est-à-dire ne contenant pas un autre acide gras déjà lié. Une solution mère de S1P dans de l'eau contenant de la BSA (60 μM) a été préparée. Pour cela, la poudre de S1P a d'abord été dissoute dans du méthanol (> 0.3 mg/mL) et des aliquots ont été préparés. Le méthanol a été évaporé avec un flux d'azote ce qui permet le dépôt d'un film de S1P sur les parois du tube en verre. La S1P ainsi déposée a été reprise dans la solution eau/BSA puis la solution a été chauffée à 37 °C puis vortexé pendant 30 minutes pour faciliter la solubilisation.

3.2.1.6.2 Solutions de S1P fluorescéine dans le méthanol

La limite de solubilisation de la S1P fluorescéine dans le méthanol est de 1 mg/mL [114]. Un volume de 1 mL de méthanol a été ajouté aux 50 μg de S1P fluorescéine présent dans le tube en plastique d'origine. La solution a été immédiatement transférée dans un tube en verre

puis vortexée pendant 2 minutes à l'obscurité. Des sous-dilutions ont été réalisées pour la préparation d'aliquots.

3.2.1.7 Méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée

Deux méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée ont été mise en œuvre dans le but d'améliorer l'homogénéité de la couche de MIP et de contrôler son épaisseur. La première méthode a consisté à greffer le sodium diéthylthiocarbamate par exposition aux UVs sur une surface de silicium modifiée avec l'organosilane p-(chlorométhyl)phényl triméthoxysilane, à réaliser la synthèse *in situ* de l'inifertter (de l'anglais *initiator-transfer agent-terminator*) dithiocarbamate puis de polymériser le MIP en surface par une nouvelle exposition aux UVs. La seconde méthode a eu pour but de greffer directement l'inifertter commercial BDC sur une surface de silicium modifiée au MAPTMS par exposition aux UVs puis à réaliser la photopolymérisation du MIP. Dans les deux cas la formulation du MIP-S1P 1 a été utilisée mais sans la présence de l'initiateur.

3.2.1.7.1 Synthèse *in situ* de l'inifertter dithiocarbamate

Les substrats ont été rincés à l'acétone, l'éthanol, l'eau, séchés sous azote puis activés par UV-ozone pendant 1h. Ils ont été placés dans une solution de p-(chlorométhyl)phényl triméthoxysilane (2.7 mmol) dans du dry THF sous agitation, chauffés à 60 °C pendant 48h, puis rincés avec du THF et séchés à 40 °C pendant une nuit. Ils ont été placés dans du CCl₄ et une solution de hexaméthyl disilazane (2.51 mmol) a été ajoutée pour une incubation sous agitation de 4 h à température ambiante. Les substrats ont été rincés avec du CH₂Cl₂ et séchés à 40 °C sous vide pendant une nuit. Ils ont été placés dans une solution de dry THF et du sodium diéthylthiocarbamate (0.27 mmol) préparé dans du dry THF (2mL) a été ajouté goutte à goutte pour une incubation sous agitation pendant 4 h. Ils ont été exposés aux UVs sous agitation durant 24h. Ils ont été rincés avec du THF puis séchés à 40 °C sous vide pendant une nuit. Les substrats ont enfin été immergés dans la solution de pré-polymérisation du MIP-S1P 1 (sans l'initiateur) privée d'oxygène et exposés aux UVs (3mW/cm²) pendant 48 h.

3.2.1.7.2 Greffage de l'inifertter BDC

Les substrats modifiés au MAPTMS ont été immergés dans une solution de N,N'-diéthylthiocarbamic acid benzyl ester (inifertter BDC) à 1 mM dans l'acétonitrile privé d'oxygène et exposés aux UVs (Lampe UV Fisher Bioblock Scientific, 230V AC 50 - Vilber T6-L : 365nm, 6W) pendant 6h sous agitation. Ils ont été retirés de la solution et directement placés dans la solution de pré-polymérisation du MIP-S1P 1 (sans l'initiateur) privée d'oxygène et exposés aux UVs (365nm, 6W) sous agitation pendant 90 h.

3.2.2 Résultats et discussion

Afin d'évaluer la capacité de reconnaissance du MIP pour la S1P, des tests de liaison ont été effectués par microscopie optique de fluorescence avec les échantillons en silicium recouvert des spots de MIP et par Microbalance à Cristal de Quartz (QCM) dont les capteurs ont été recouvert d'une fine couche de MIP. Le protocole détaillé de chacun de ces deux tests de liaison est présenté dans la partie *Matériels et méthodes*. Avant de réaliser les tests de liaison, nous avons souhaité caractériser les couches de MIP déposées à la surface des substrats. Cette caractérisation a été effectuée en microscopie optique pour les échantillons de silicium et en Microscopie à Force Atomique (AFM) pour les capteurs de QCM. Les résultats de cette caractérisation et aux tests de liaison obtenus avec les deux types de substrats sont présentés tour à tour dans les paragraphes suivant.

3.2.2.1 Echantillons de silicium

3.2.2.1.1 Caractérisation des spots de MIP par microscopie optique

Comme expliqué dans la partie *Matériels et méthodes*, des spots de MIP d'un diamètre d'environ 1,5 mm ont été obtenus à la surface d'échantillons de silicium (15 x 15 mm) par la méthode de photopolymérisation couplée à une technique de photolithographie à travers un masque opaque. Afin de vérifier l'accroche du polymère à la surface et de caractériser l'homogénéité des spots de MIP nous avons réalisé une analyse par microscopie optique, immédiatement après l'étape d'extraction de la molécule *template*. Des exemples représentatifs des résultats obtenus pour les spots de MIP de différents échantillons ont été regroupés sur la figure 3.5.

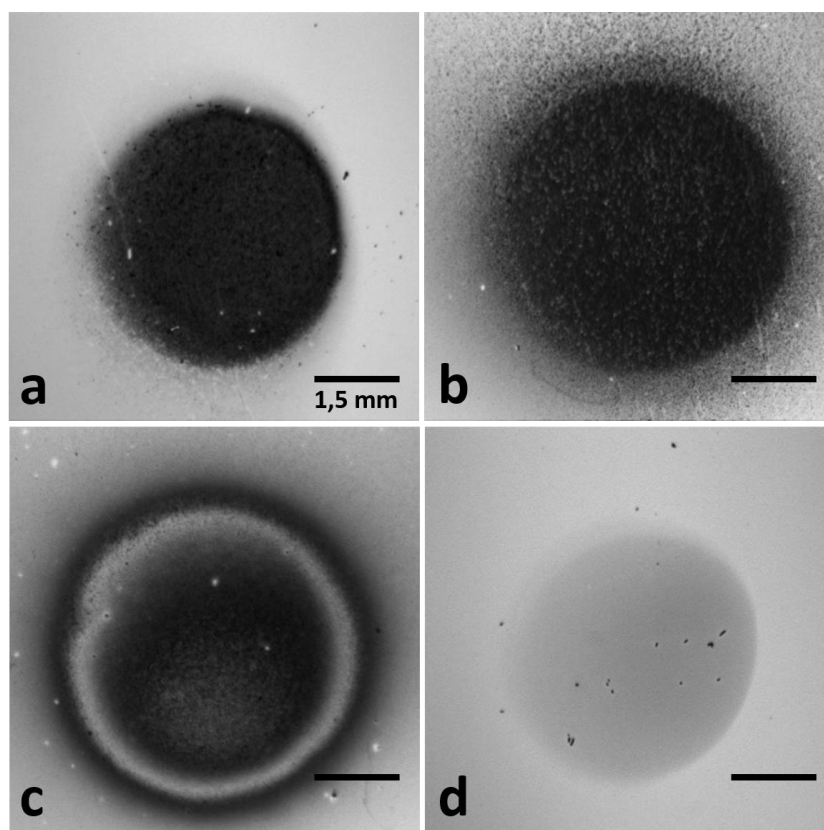


Figure 3.5 : Images de microscopie optique (x5) de différents spots de MIP provenant de différents échantillons et obtenues immédiatement après l'étape d'extraction de la molécule template.

La première chose que l'on peut constater est que le dépôt de polymère est toujours présent après l'étape d'extraction de la molécule *template*. Ce résultat semble prouver l'efficacité du protocole de silanisation pour l'accroche covalente du MIP à la surface (voir *Matériels et méthodes*).

Par contre, l'homogénéité des dépôts est très variable selon les échantillons et parfois pour un même spot (voir figure 3.5 c). Ces variations pourraient être dues à des différences de placement et d'orientation des échantillons sous la lampe UV ou à l'inclinaison aléatoire de la lamelle de verre et du masque appliqués manuellement sur la goutte de solution de pré-polymérisation.

Pour l'un des spots, la surface de dépôt paraît plus importante et son bord n'est pas bien défini (figure 3.5 b). Ces caractéristiques pourraient être la conséquence d'effets de diffraction de la lumière plus importants au niveau du trou correspondant à ce spot ou d'un temps d'insolation plus important.

Sur les figures 3.5 a et c on constate ce même effet de diffraction mais de façon plus réduite. Dans le cas du spot figure 3.5 c, le dépôt semble plus épais au centre et en périphérie où le polymère forme comme un anneau. Ce profil pourrait provenir d'une pression de contact trop importante entre l'échantillon et la lamelle de verre qui aurait pu chasser une partie de la solution de pré-polymérisation vers la périphérie.

Enfin, sur la figure 3.5 d on peut voir que l'épaisseur du dépôt est moins importante et que le spot n'est pas totalement formé. Cela pourrait être le résultat d'une puissance ou d'un temps d'exposition insuffisant, d'un étalement de la solution de pré-polymérisation plus important à ce niveau, ou encore d'une accroche d'une partie du polymère sur la lamelle de verre.

L'inhomogénéité observée est inhérente à la méthode de photopolymérisation employée. Afin d'améliorer ces résultats, nous avons essayé d'étaler la solution de pré-polymérisation par « *spin-coating* » et de réaliser l'étape de photolithographie en mode contact ou de proximité sur un équipement standard de photolithographie, à travers un masque classique en quartz ou un masque souple imprimé avec de l'encre. Malheureusement, aucune polymérisation n'a pu être obtenue par ces méthodes. Il semble que la viscosité de la solution de pré-polymérisation en l'état n'est pas bien adaptée à la méthode de « *spin-coating* » et que la présence d'oxygène, inhibiteur de polymérisation est un facteur limitant important. Il serait intéressant de répéter ces tests sous atmosphère contrôlée, par exemple en boîte à gants. Malgré cette inhomogénéité le test de liaison a été réalisé et afin de limiter l'impact de la différence d'épaisseur sur les résultats, les échantillons contenant les spots les plus similaires possibles ont été utilisés.

3.2.2.1.2 Test de liaison par microscopie optique de fluorescence

Après l'étape d'extraction de la molécule *template*, l'échantillon a été immergé dans une solution contenant de la S1P fluorescéine à 1,3 μM dans du méthanol pendant 12h, rincé brièvement avec de l'acétone et de l'éthanol pour éliminer les liaisons non spécifiques, avant de subir une nouvelle procédure d'extraction. Ce cycle de trois étapes a été répété deux fois pour un seul et même échantillon. Des images de microscopie optique de fluorescence de chaque spot ont été obtenues à la suite de chaque étape. En parallèle, les mêmes cycles ont été reproduits sur un autre échantillon mais en remplaçant la S1P fluorescéine par de la fluorescéine seule à la même concentration (1,3 μM) et dans le même solvant en tant que contrôle.

Comme dans le chapitre 2, nous avons fait l'hypothèse que la S1P fluorescéine serait capable, malgré la présence du groupement fluorescent de diffuser à travers les pores micrométriques de la matrice polymérique et de se fixer au moins en partie aux sites de reconnaissance accessibles, proches de la surface. Cette hypothèse pourrait être d'autant plus valable dans ce cas de structuration du MIP en surface, de par la réduction de l'épaisseur de la matrice polymérique et l'amélioration d'accessibilité jusqu'aux empreintes qu'elle entraîne.

Les résultats obtenus pour ce test de liaison sont présentés dans la figure 3.6.

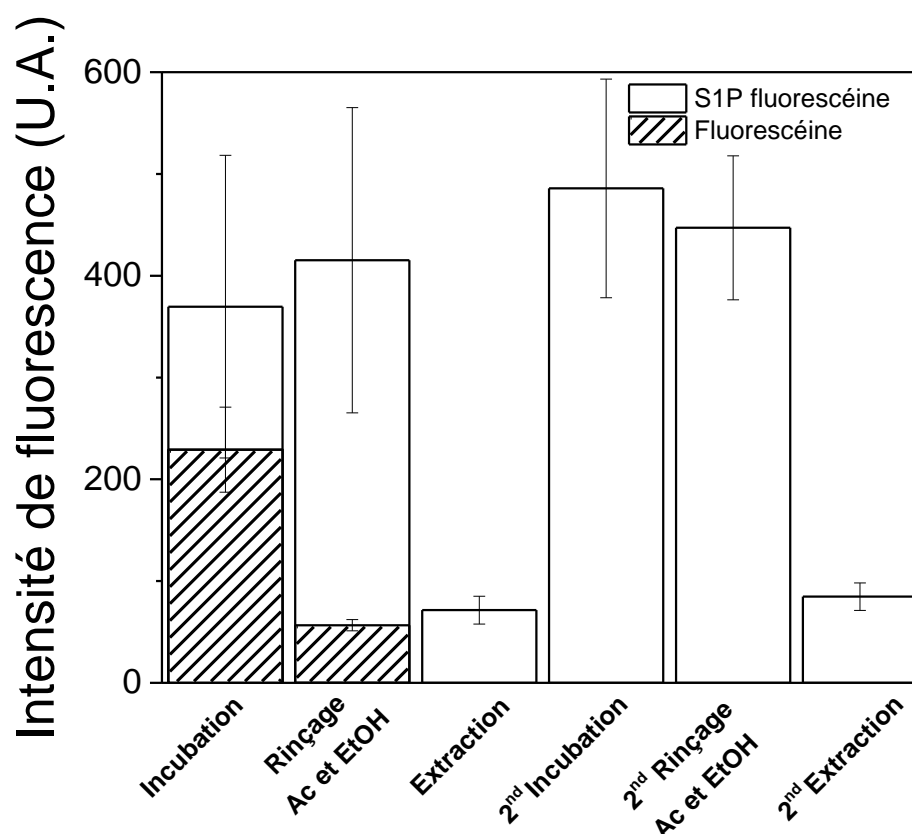


Figure 3.6 : Moyenne de l'intensité de fluorescence sur huit spots de MIP d'un échantillon exposé à $1,3 \mu\text{M}$ de S1P fluorescéine dans du méthanol pendant 12h (non hachuré) après l'incubation avec la molécule fluorescente, après le bref rinçage à l'acétone et à l'éthanol et après l'extraction de la molécule cible pour deux cycles distincts répétés avec le même échantillon. Moyenne de l'intensité de fluorescence des huit spots de MIP d'un échantillon exposé à $1,3 \mu\text{M}$ de fluorescéine seule en tant que contrôle dans du méthanol pendant 12h (hachuré) après l'incubation avec la molécule fluorescente et après le bref rinçage à l'acétone et à l'éthanol pour le premier cycle ($n=8$, $N=1$).

Pour les échantillons incubés dans la S1P fluorescéine nous pouvons constater que les intensités de fluorescence mesurées après l'incubation et après le rinçage à l'acétone et à l'éthanol sont similaires. Ce résultat semble démontrer que le MIP est capable de lier la S1P fluorescéine, ce qui confirme notre première hypothèse et que les interactions entre le polymère et la molécule cible sont spécifiques. Dans le cas contraire, il est probable que l'intensité de fluorescence mesurée aurait chuté suite au rinçage à l'acétone et à l'éthanol. Après l'extraction de la molécule cible, nous pouvons voir que l'intensité de fluorescence diminue significativement, ce qui semble indiquer que la procédure d'extraction est efficace et que la majorité des molécules de S1P fluorescéine sont extraites de la matrice polymérique. Des résultats identiques sont obtenus lors d'un second cycle suggérant que les sites de reconnaissances du MIP ont été régénérés et qu'ils sont de nouveau accessibles.

Concernant, les échantillons incubés dans la fluorescéine seule, nous voyons que l'intensité de fluorescence chute de façon significative à la suite du rinçage à l'acétone et à l'éthanol. Il

aurait été intéressant de réaliser la même expérience avec le NIP exposé à la S1P fluorescéine pour un autre contrôle, malheureusement, comme indiqué dans la partie 3.2.1.3, avec la solution de pré-polymérisation du NIP, aucune polymérisation n'a pu être obtenue. L'intensité de fluorescence observée après l'étape d'incubation semble donc due à des liaisons non spécifiques entre le MIP et la fluorescéine. Ce résultat pourrait confirmer les propriétés de reconnaissance spécifique du MIP vis-à-vis de la S1P fluorescéine.

3.2.2.1.3 Conclusions et perspectives

Les résultats du test de liaison par microscopie de fluorescence suggèrent que le MIP-S1P est doté de propriétés de reconnaissance vis-à-vis de la S1P et par rapport à la fluorescéine seule en tant que contrôle. Les liaisons observées semblent spécifiques et sont probablement le résultat des interactions entre le monomère fonctionnel AB acétate et le groupe phosphate de la S1P fluorescéine et peut être en partie, d'une reconnaissance de forme.

Pour pouvoir confirmer ces résultats, il faudra réaliser des nouveaux tests de liaison avec un nombre plus important d'échantillons et surtout avec des spots de MIP d'épaisseur homogène. La méthode de photolithographie devra être améliorée dans le but de pouvoir contrôler la taille et l'épaisseur des dépôts de polymère.

La concentration d'incubation de S1P fluorescéine utilisée pour ce test de liaison est dans la limite supérieure (1,3 μM) des concentrations de S1P présentes dans le plasma sanguin (0,2 à 1 μM) et il sera important de réaliser le test avec une concentration inférieure, surtout si l'objectif est de quantifier la forme libre de la S1P dont la concentration est encore plus faible (estimation de 7,3 à 45 nM).

L'utilisation de la S1P fluorescéine est utile d'un point de vue pratique, mais la présence du groupement fluorescéine pourrait avoir un impact non négligeable sur les propriétés de reconnaissance. Il sera donc nécessaire de réaliser le test de liaison avec la S1P non fluorescente et pour cela un moyen de détection sans marquage devra être utilisé. On peut aussi envisager de mener des tests de compétition entre la S1P et la S1P fluorescéine toujours par des mesures de fluorescence. Des tests de liaison avec des analogues structuraux de la S1P pourront être réalisés afin d'évaluer la sélectivité du MIP pour la S1P et de valider ses propriétés de reconnaissance de forme et de taille. Ces tests devront être à terme effectués dans des milieux aqueux puis dans le plasma sanguin.

3.2.2.2 Capteurs de microbalance à cristal de quartz

3.2.2.2.1 Caractérisation des couches de MIP par microscopie à force atomique

Comme décrits dans la partie *Matériels et méthodes*, des fines couches de MIP ont été déposées à la surface des capteurs de Microbalance à Cristal de Quartz (QCM). Afin de vérifier l'accroche du polymère à la surface et de caractériser la morphologie de la couche de polymère nous avons réalisé une analyse par Microscopie à Force Atomique (AFM) immédiatement après l'étape d'extraction de la molécule *template*. La surface d'un capteur

de QCM recouverte de MIP a été comparée à la surface d'un capteur de QCM vierge. Les résultats obtenus sont présentés figure 3.7.

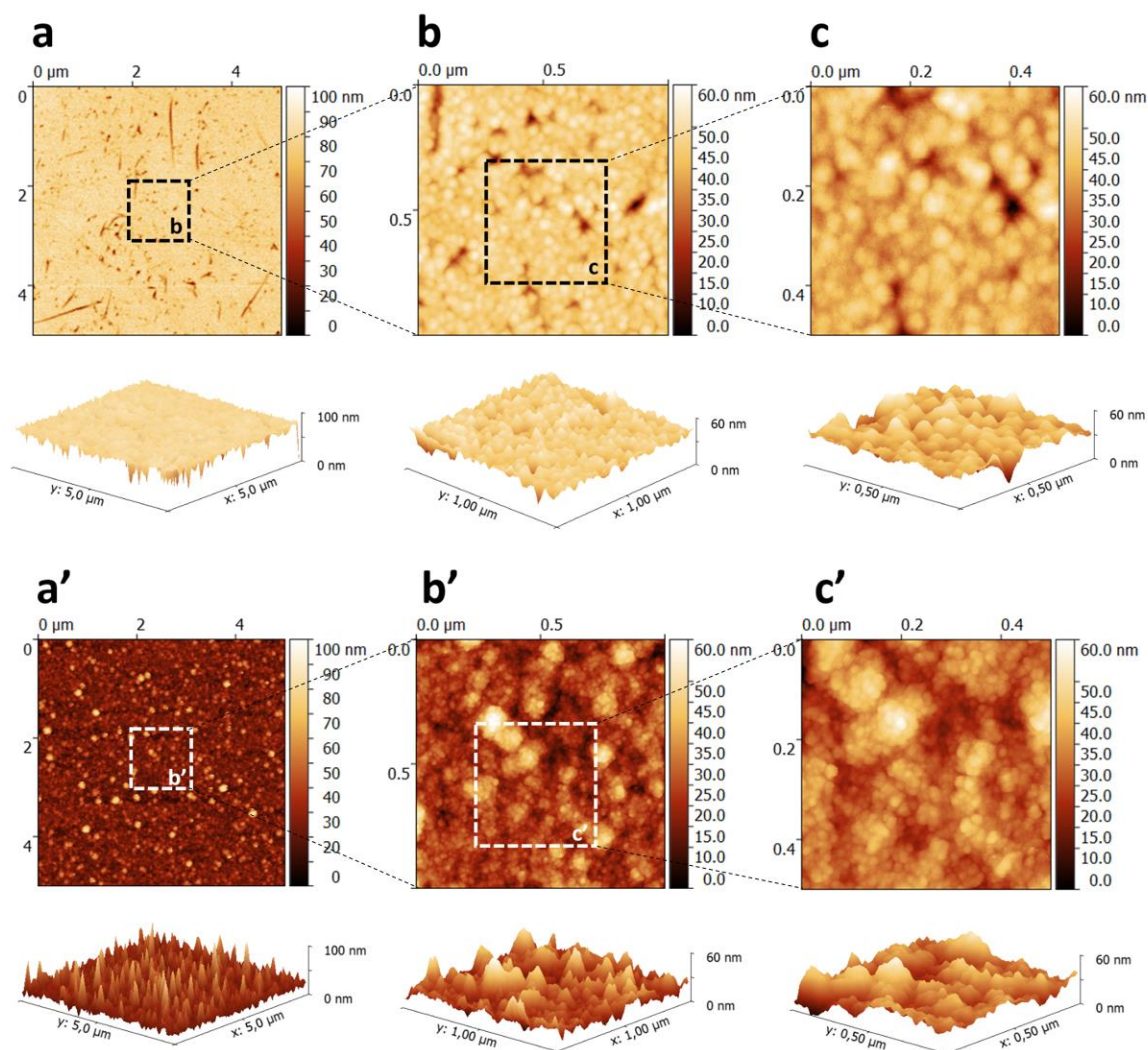


Figure 3.7 : Images AFM de hauteur de la surface d'un capteur de QCM vierge à différentes échelles (a, b, c) et de la surface d'un capteur de QCM recouvert de MIP (a', b', c') avec leur représentations en 3D associées.

Concernant le capteur de QCM vierge, nous constatons que la surface n'est pas totalement plane et on observe comme des grains d'un diamètre d'environ 40 nm. D'après la littérature, il s'agit d'une morphologie déjà observée pour les capteurs de QCM en SiO₂ [143]–[145].

Pour le capteur de QCM recouvert de la couche de polymère on peut voir que la morphologie est complètement différente et caractéristique d'un MIP. Il s'agit d'une matrice polymérique poreuse constituée d'agrégats de particules à différentes échelles. Sur la figure 3.7 a' on observe des particules d'un diamètre de 50 à 100 μm et des pores d'une taille de 100 à 400 μm. Sur la figure 3.7 b' et c' on s'aperçoit que les particules observées sont en fait des agrégats de particules de diamètre plus faible (environ 12 nm). Ces résultats confirment bien l'accroche

de la couche de MIP à la surface du capteur de QCM et permettent de vérifier que la couche de MIP a bien une structure poreuse caractéristique. Les représentations en 3D montrent que la topographie de la surface du capteur de QCM recouvert de la couche de MIP diffère de celle de la surface du capteur vierge (voir figures 3.7 a et a'). Il est difficile de mesurer précisément l'épaisseur moyenne de la couche de MIP par cette méthode d'observation mais on peut néanmoins faire l'hypothèse qu'elle est de l'ordre de 50 nanomètres.

3.2.2.2 Test de liaison par microbalance à cristal de quartz

Les détails des deux expériences différentes qui ont été réalisées sont présentés dans la partie *Matériels et méthodes*. Dans ces deux expériences, la S1P a été solubilisée dans un mélange eau/BSA. En effet, nous voulions nous rapprocher des conditions d'utilisation finale de notre MIP en menant les tests de liaison dans un milieu aqueux. Or, la procédure classique de solubilisation de la S1P dans un tel milieu, comme par exemple les milieux de culture cellulaire, impose l'utilisation de la BSA. Ce protocole s'inspire de la liaison qui se forme naturellement entre l'albumine et la S1P et qui permet le transport de cette dernière dans le plasma sanguin [45]. D'autres expériences de QCM ont été réalisées avec la S1P dans le méthanol mais n'ont pas abouti.

▪ Expérience n°1 :

Dans l'expérience n°1, la liaison de la S1P à la surface d'un capteur de QCM recouvert de MIP (capteur 1) a été comparée aux résultats obtenus avec un capteur vierge (capteur 2). Pour cela les deux capteurs de QCM ont été exposés au passage d'un flux de solution eau/BSA (60 μ M) puis à un flux d'eau seule et enfin à un flux de S1P (3500 nM) dans une solution eau/BSA (60 μ M) pour une incubation en mode statique pendant une heure. Les capteurs ont finalement été rincés à l'eau. Les résultats, représentant les variations de la fréquence de résonance en fonction du temps, obtenus lors de cette expérience sont représentés dans la figure 3.8.

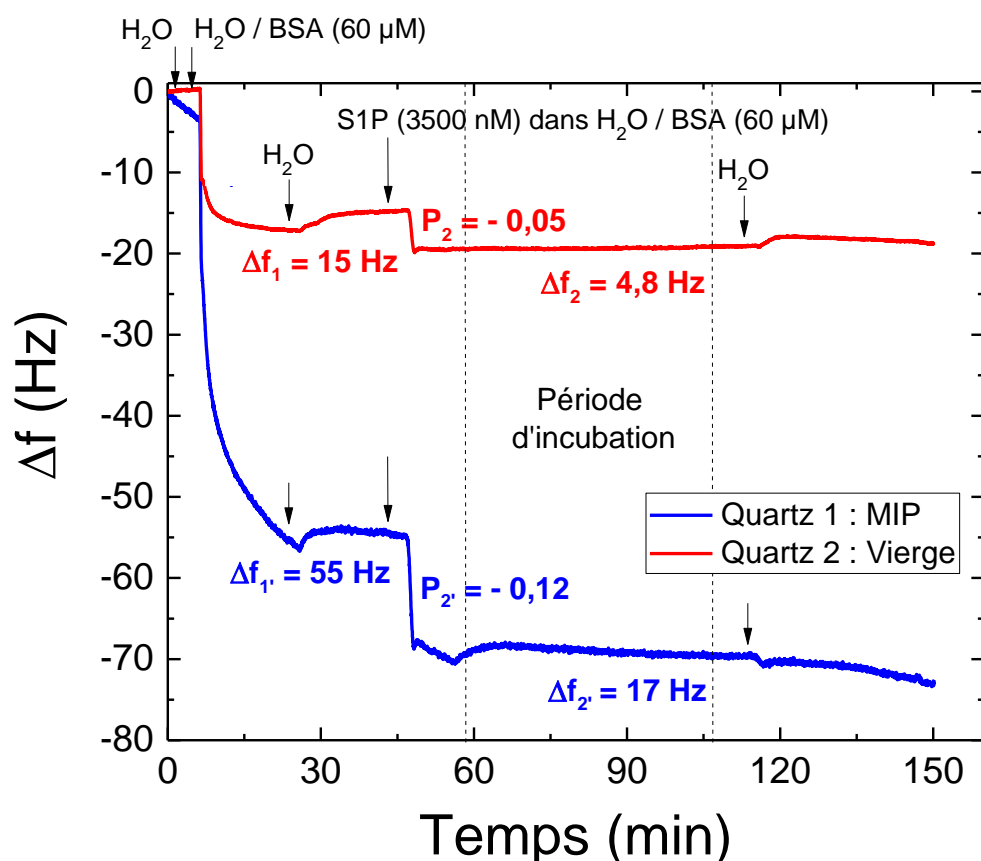


Figure 3.8 : Variations de la fréquence fondamentale des capteurs de QCM en fonction du temps.

Sachant que la BSA a un poids moléculaire presque 200 fois supérieur à celui de la S1P, son utilisation dans la méthode de solubilisation pose question lorsque l'on souhaite observer la liaison de la S1P au MIP par des variations de fréquence qui traduisent des variations de masse. Dans un raisonnement proche à celui suivi dans le cas de la S1P fluorescéine nous avons fait l'hypothèse que le complexe S1P-BSA pourrait se lier seulement aux sites de reconnaissance exposés en surface. Contrairement au cas de la S1P fluorescéine, il est certain que du fait de sa taille importante, le complexe S1P-BSA ne pourra pas diffuser à travers la porosité micrométrique de la matrice polymérique pour venir se loger dans des sites de reconnaissances non exposés en surface. En admettant que cette hypothèse soit valable, il nous fallait trouver un moyen de s'affranchir au maximum des variations de fréquence provoquées par la BSA de manière à pouvoir déterminer celle dues seulement à la S1P. L'idée que nous avons eue a été de saturer les surfaces par la BSA avant de procéder au passage et à l'incubation avec la solution contenant le complexe S1P-BSA. Pour ce faire, nous avons appliqué un flux de solution eau/BSA avant de rincer les surfaces avec de l'eau pour retirer les molécules de BSA déposées mais non liées. Nous pouvons voir sur la figure 3.8 que le passage de la solution eau/BSA sur les capteurs fait chuter la fréquence de résonance, ce qui traduit l'adsorption des molécules de BSA à la surface. Lorsque les capteurs sont rincés à l'eau on

constate une légère remontée de la fréquence de résonance qui correspond à la désorption d'une partie des molécules de BSA. La variation de fréquence de résonance est mesurée entre la valeur de fréquence avant le passage de la solution eau/BSA et la valeur de fréquence après le rinçage à l'eau et on peut voir qu'elle est plus importante pour le capteur 1 (50 Hz) que pour le capteur 2 (15 Hz). Ce résultat semble indiquer que la BSA s'adsorbe de façon plus importante au MIP qu'à la surface de silicium vierge.

Lorsque l'on applique le flux la solution de S1P à 3500 nM dans le mélange eau/BSA, une nouvelle chute de fréquence mais beaucoup plus réduite est observée. Cette réduction pourrait signifier que les surfaces avaient bien été saturées en BSA et que peu de nouvelles molécules de BSA étaient en mesure de s'adsorber. Après une heure d'incubation, un rinçage à l'eau a été effectué et les variations de fréquences ont été mesurées pour les deux capteurs. Nous constatons que la variation de fréquence du capteur 1 (17 Hz) est plus importante que celle du capteur 2 (4,8 Hz). Si l'on considère qu'aucune nouvelle molécule de BSA n'a été nouvellement liée à la surface alors les variations de fréquence observées pourraient être la conséquence de l'adsorption de la S1P à la surface des capteurs. Si tel est le cas, la valeur de variation de fréquence plus importante observée pour le capteur 1 pourrait démontrer les capacités de reconnaissance spécifique du MIP pour la S1P. De plus, les coefficients directeurs associés aux courbes au niveau de la chute de fréquence correspondante au passage de la solution de S1P sont différentes entre les deux capteurs (P2' et P2) sont différents ce qui pourrait traduire une cinétique d'interaction différente. Ce résultat pourrait appuyer l'hypothèse de la liaison privilégiée de la S1P avec le MIP.

Basée sur de nombreuses hypothèses qu'il reste à vérifier, l'expérience n°1 nous a permis de montrer qu'il y aurait bien une capacité de reconnaissance du MIP pour la S1P. Il aurait été très intéressant de comparer le MIP avec un NIP plutôt qu'avec une surface vierge mais malheureusement, nous n'avons pas réussi à préparer le NIP par la méthode de photopolymérisation. L'inconvénient de l'expérience n°1 est qu'elle ne permet pas de connaître la part relative des interactions spécifiques et non spécifiques dans les variations de fréquences observées, il n'est donc pas possible d'estimer la masse de S1P liée aux sites de reconnaissance du MIP. Une option aurait pu être de considérer que la variation de fréquence du capteur 2 correspondait en totalité à des interactions non spécifiques de S1P avec la surface et de soustraire la valeur de cette variation de fréquence à celle obtenue avec le quartz recouvert de MIP, dans l'espoir de déterminer la variation de fréquence qui correspondrait en totalité à des interactions spécifiques de la S1P avec le MIP. Mais, comme les surfaces du capteur 1 et du capteur 2 ne sont pas identiques, il est fortement probable que les interactions non spécifiques entre les deux ne soient pas les mêmes. Nous avons donc préféré concentrer nos efforts sur la mise en place d'un deuxième type d'expérience.

▪ **Expérience n°2 :**

Dans l'expérience n°2, deux capteurs de QCM, tous deux recouverts d'une couche du même MIP-S1P ont été testés. L'un des capteurs (capteur 2) a été exposé à un flux de la solution eau/BSA (60 μM) et l'autre (capteur 1) à un flux de solution de S1P (700 μM) dans le mélange eau/BSA (60 μM). En admettant que la BSA s'adsorbe à la surface de façon identique pour les deux couches de MIP et que le complexe S1P-BSA est capable de se lier avec les sites de reconnaissance exposés en surface, ce protocole nous permettrait de déterminer la part de variation de fréquence uniquement provoquée par la liaison de la S1P avec le MIP. Les résultats de cette expérience sont représentés dans la figure 3.9.

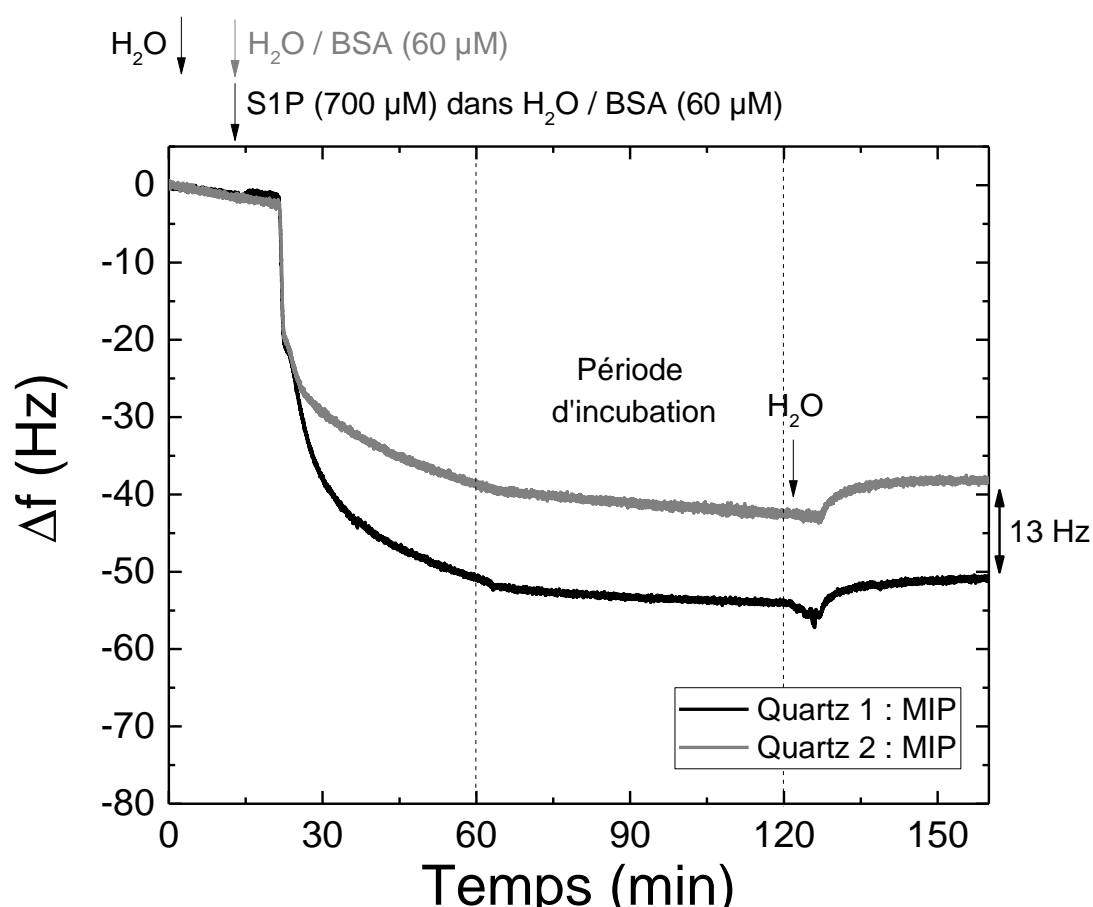


Figure 3.9 : Variations de la fréquence fondamentale des capteurs de QCM en fonction du temps.

Nous constatons après rinçage que la variation de fréquence du capteur 1 (50 Hz) est plus importante que celle du capteur 2 (37 Hz). Si l'on admet que les hypothèses précédentes sont valables, la différence entre ces deux variations, d'une valeur de 13 Hz pourrait correspondre à la liaison spécifique de la S1P avec les sites de reconnaissance du MIP.

En utilisant la relation établie par Sauerbrey qui relie la variation de masse à la variation de fréquence (voir Matériels et méthodes), on peut estimer la variation de masse liée par le MIP au cours du test de liaison. Comme on l'a rappelé dans la partie *Matériels et méthodes*, il ne sera pas possible de déterminer précisément la masse absolue de S1P liée par le MIP du fait de la présence des molécules d'eau également piégées à la surface mais on pourra estimer une valeur approximative.

Après avoir vérifié que l'on se trouvait bien dans des conditions de validité d'utilisation du modèle de Sauerbrey, nous avons calculé la variation de masse par unité de surface correspondante à chaque variation de fréquence mesurée et l'avons tracé en fonction du temps (voir figure 3.10).

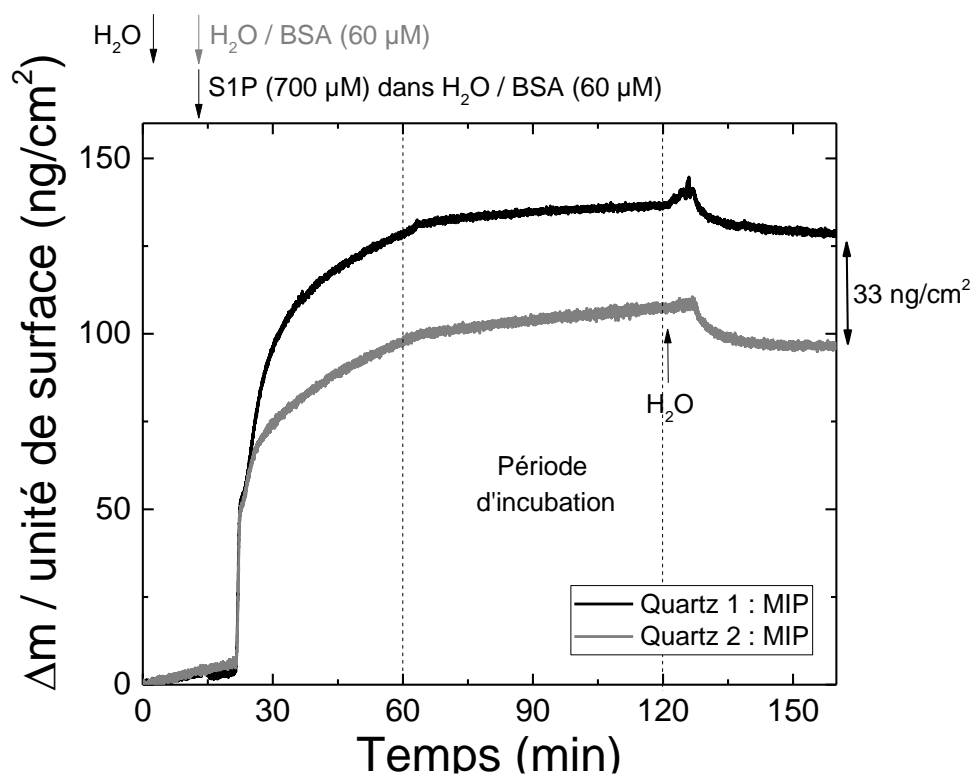


Figure 3.10 : Variations de masse adsorbée par unité de surface des capteurs de QCM en fonction du temps.

Nous obtenons une variation de masse par unité de surface qui pourrait être due à la liaison de la S1P avec le MIP d'environ $33 \text{ ng}/\text{cm}^2$. Sachant que la surface active du capteur de quartz est de $1,54 \text{ cm}^2$, la masse de S1P liée au MIP serait d'environ 50 ng ce qui correspond à $0,131 \text{ nmoles}$. Etant donné que l'on a appliqué un flux de solution de S1P ($700 \mu\text{M}$) à un débit de $30 \mu\text{L}/\text{minutes}$ pendant environ 45 minutes, le MIP a été exposé à une quantité totale de $0,945 \text{ nmoles}$ de S1P. Le MIP a donc été capable de lier environ 14 % de la quantité de S1P à laquelle il a été exposé. Comme la variation de fréquence est aussi due à la présence des molécules d'eau, ce pourcentage de liaison est probablement surévalué. La capacité de liaison du MIP dans ces conditions semble donc assez faible.

En plus de la variation de la fréquence de résonance, la variation du facteur de dissipation D a aussi été enregistrée lors de l'expérience n°2 (voir *Matériels et méthodes*). Il a été démontré que son traitement en complément de celui de la variation de fréquence de résonance permet l'analyse qualitative de la rigidité de la couche déposée et de la cinétique des interactions [146], [147]. Une des manières d'exploiter cette donnée consiste en la représentation sur le même graphe de la variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence. Dans cette représentation, comme la perte d'énergie est proportionnelle à la quantité de matériel déposé à la surface, une ligne droite caractérisée par un changement vers les valeurs négatives de fréquence et un changement vers les valeurs positives de dissipation $[-f, +D]$ correspond à la déposition d'une couche homogène. Inversement, une ligne droite caractérisée par un changement vers les valeurs positives de fréquence et un changement vers les valeurs négatives de dissipation $[+f, -D]$ révèle une perte de matière (voir figure 3.11).

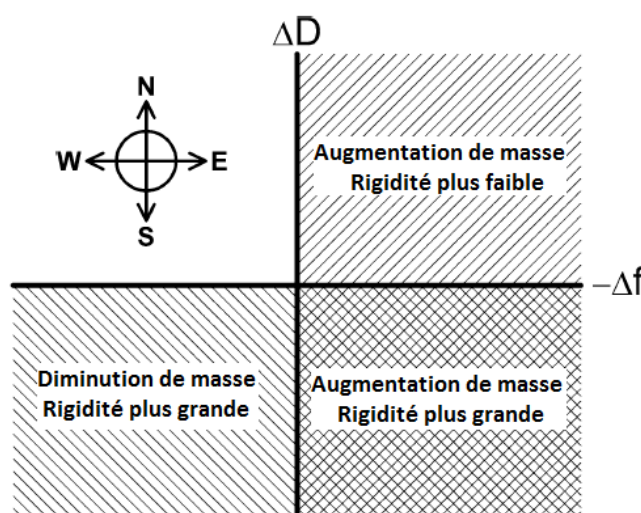


Figure 3.11 : Schéma d'interprétation de la représentation de ΔD en fonction de Δf .

Toutes déviations par rapport à la ligne droite ou changement de direction sont causés par un changement de masse et des propriétés viscoélastiques de la couche. De plus, comme les données sont acquises par intervalles de temps régulier, deux points successifs rapprochés traduisent un processus lent alors que deux points successifs éloignés traduisent un processus rapide et on peut ainsi en déduire la cinétique du phénomène en question [146]–[148]. Ces représentations ont été tracées pour les deux capteurs (voir figure 3.12).

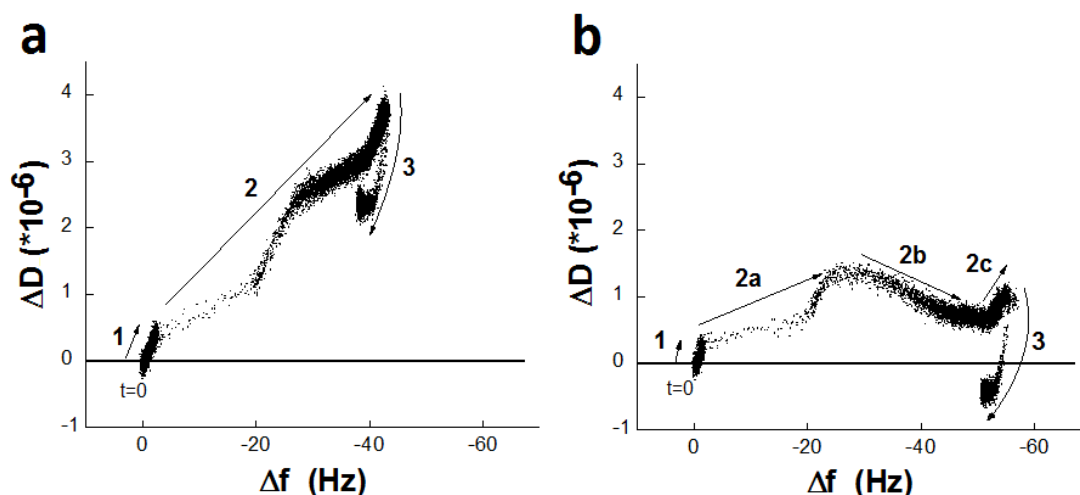


Figure 3.12 : Courbes de ΔD en fonction de Δf pour le capteur recouvert de MIP non exposé à la S1P (a) et pour le capteur recouvert de MIP exposé à la S1P au cours de l'expérience n°2.

Les courbes obtenues peuvent être divisées en trois phases distinctes (1, 2 et 3) et les profils obtenus ne sont pas identiques pour les deux capteurs ce qui traduit des différences dans les interactions et les propriétés viscoélastiques de la couche déposée.

La phase 1 correspond au passage de l'eau sur la surface, la phase 2 au passage de la solution de S1P dans le mélange eau/BSA et la phase 3 au rinçage à l'eau.

La phase 1 est similaire pour les deux capteurs et la direction et le sens de la flèche $[-f, +D]$ indiquent une augmentation de la masse à la surface et une plus grande perte d'énergie par dissipation, donc une diminution de la rigidité de la couche. Ces variations pourraient s'interpréter comme étant le résultat de l'adsorption des molécules d'eau à la surface.

Pour le capteur 2, la direction et le sens de la flèche $[-f, +D]$ indiquent de nouveau une augmentation de la masse à la surface et une diminution de la rigidité de la couche. Ces variations pourraient s'interpréter comme étant le résultat de l'adsorption des molécules d'eau et de BSA à la surface.

Pour le capteur 1, la phase 2 peut être décomposée en trois parties (2a, 2b, 2c). La phase 2a est caractérisée par une direction de type $[-f, +D]$ qui traduit une augmentation de la masse à la surface et une diminution de la rigidité de la couche et pourrait s'interpréter comme étant le résultat de l'adsorption des molécules d'eau, de S1P et de BSA à la surface. La phase 2b est caractérisée par une direction de type $[-f, -D]$ qui traduit une augmentation de la masse à la surface et une augmentation de la rigidité de la couche. L'augmentation de la rigidité de la couche pourrait s'expliquer par la fixation des molécules de S1P dans les empreintes moléculaires du MIP qui pourrait avoir pour conséquence de rigidifier la matrice. La phase 2c est caractérisée par une direction de type $[-f, +D]$ qui traduit une augmentation de la masse à la surface et une diminution de la rigidité de la couche. La compréhension de ce dernier résultat n'est pas encore claire.

Pour les deux capteurs, on peut constater que la cinétique du processus correspondant à la phase 2 est rapide puis ralentit pour devenir constante jusqu'à la phase 3. Il est possible que

l'adsorption des molécules soit rapide au début de l'instauration du flux puis ralentisse du fait d'une saturation de la surface. La partie constante de la cinétique de la phase 2 correspond à l'incubation pendant laquelle le flux est stoppé. La phase 3 est caractérisée par une direction de type [+f, -D] qui traduit une diminution de la masse à la surface et une augmentation de la rigidité de la couche qui correspondraient à la désorption des molécules de BSA et possiblement de S1P lors du rinçage à l'eau.

3.2.2.2.3 Conclusions et perspectives

L'utilisation de la microbalance à cristal de quartz pour la réalisation du test de liaison nous a permis de démontrer par une technique sans marquage les propriétés de reconnaissance du MIP-S1P pour la S1P. La S1P semble se lier préférentiellement sur une surface de silicium recouverte de MIP plutôt que sur une surface de silicium vierge (expérience n°1) et l'hypothèse de l'instauration de liaisons spécifiques entre la S1P et le MIP pourrait être validée par les résultats de l'expérience 2. Le pourcentage de liaison de la S1P au MIP serait inférieur à 14 %. Cette faible valeur en comparaison à celle obtenus avec le MIP-S1P de la partie 2 pourrait s'expliquer par le fait que le nombre de sites de reconnaissance est diminué dans le cas d'une structuration en surface.

Cependant, l'utilisation de la BSA pour la solubilisation de la S1P pose un problème d'interprétation. En effet, nous avons analysé les résultats en faisant l'hypothèse que la BSA n'empêcherait pas la S1P de se lier, au moins en partie aux empreintes du MIP et cela reste à démontrer. De plus nous avons considéré qu'il était possible de distinguer la part de la S1P et celle de la BSA dans les variations de fréquences observées mais nous ne pouvons pas en avoir la preuve formelle. Pour pouvoir confirmer ces résultats, il faudra réaliser des nouveaux tests de liaison avec une méthode de solubilisation permettant de s'affranchir de la BSA. Il sera aussi nécessaire de tester la sélectivité du MIP avec des analogues structurels.

3.2.2.3 Utilisation de la polymérisation radicalaire contrôlée pour l'optimisation de l'homogénéité de la couche de MIP

Comme on l'a vu précédemment, l'inhomogénéité des dépôts de MIP peut poser problème dans l'interprétation des résultats.

Afin d'améliorer l'homogénéité de la couche de MIP et de pouvoir contrôler finement son épaisseur, nous avons mis en œuvre des méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée (CRP) de type polymérisation initiée par inifert en utilisant un inifert à base de diéthylthiocarbamate [92], [138]. Cette polymérisation est dite « pseudo-vivante » dans le sens où l'inifert, contrairement aux autres photoinitiateurs classiques, se décompose sous UVs en deux radicaux, dont l'un est capable d'activer la polymérisation et l'autre est stable mais capable de terminer la croissance de la chaîne polymérique par recombinaison lors de l'arrêt de la lampe UV. Lorsque la lampe UV est de nouveau mise en marche, la polymérisation

reprend. Cette propriété permet de contrôler l'épaisseur de la couche par la maîtrise du temps d'exposition aux UVs.

Dans une première expérience, nous avons essayé de greffer le sodium diéthylthiocarbamate à la surface du silicium via un organosilane par exposition aux UVs, de synthétiser *in situ* l'inifertier dithiocarbamate puis de polymériser le MIP à la surface par une nouvelle exposition aux UVs [149]. Malheureusement, aucune polymérisation n'a été obtenue. Après vérification par analyse d'énergie dispersive de rayons X (EDX) au Microscope Electronique à Balayage (MEB), il semble que l'inifertier ne soit pas présent avant l'étape de polymérisation. Ceci pourrait être la conséquence d'un temps d'exposition trop court lors de la première exposition.

Dans une seconde expérience, nous avons directement greffé l'initiateur BDC à la surface de silicium modifiée au MAPTMS par exposition aux UVs puis procédé à la polymérisation du MIP par une nouvelle exposition aux UVs [150] [151]. Une couche de MIP plus homogène a été obtenue et caractérisée par microscopie à force atomique en mode contact (voir figure 3.13).

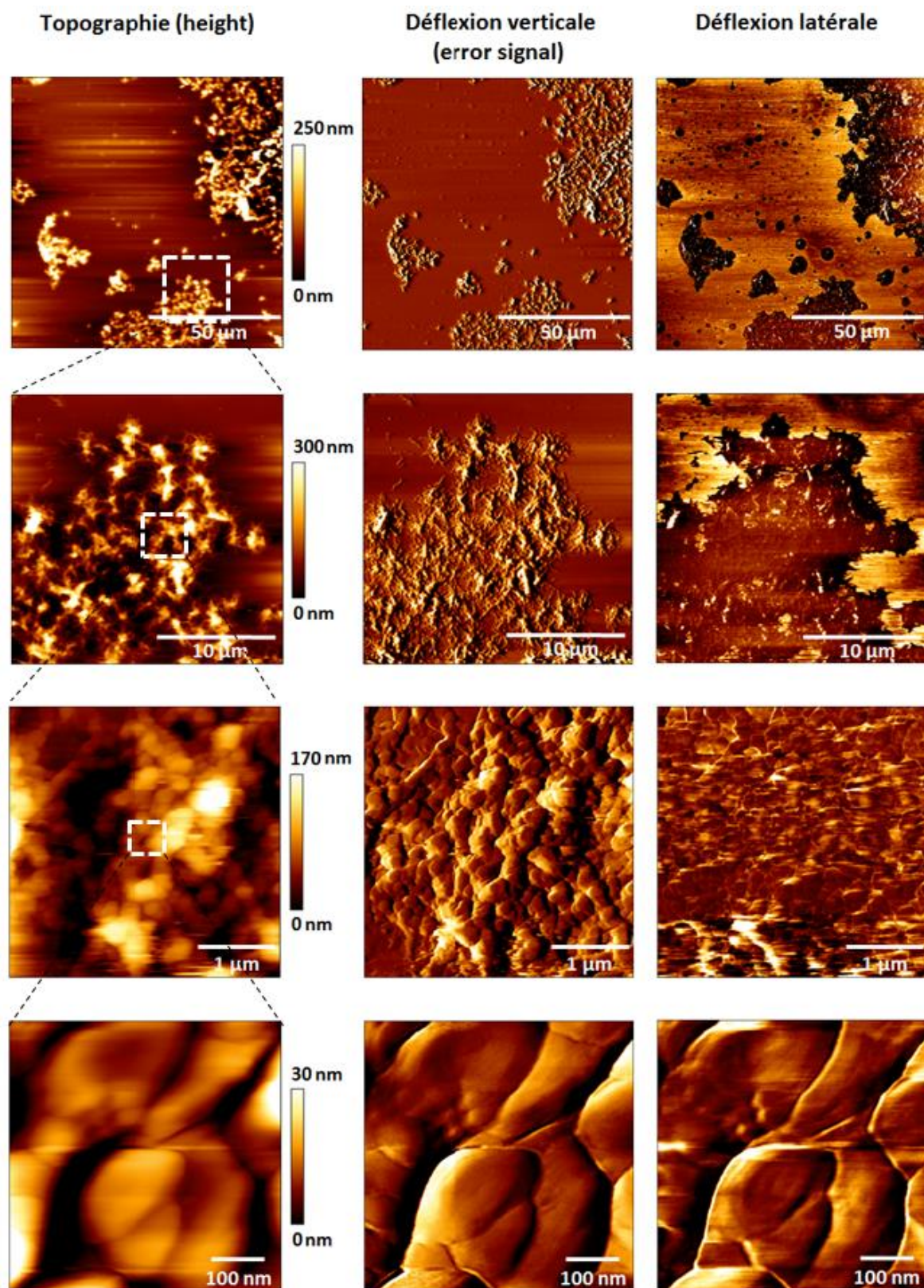


Figure 3.13 : Images AFM en mode contact à différentes échelles de la couche de MIP obtenue par polymérisation radicalaire contrôlée. Les variations de couleurs sur les images de déflexion latérale traduisent des différences de matériaux.

La couche de MIP obtenue est de l'ordre de la centaine de nanomètre et la morphologie observée est caractéristique. Malheureusement, la couche n'a pas résisté aux solvants utilisés dans le protocole d'extraction de la molécule *template*, laissant présager une mauvaise accroche du polymère au MAPTMS. Pour remédier à ce problème, des tests préliminaires réalisés par l'équipe du Professeur Karsten Haupt à l'UTC ont mené à la synthèse d'un oligomère fonctionnel à base d'inifert BDC et de 5 à 10 unités de glycidyl méthacrylate, directement « cliquable » sur des surfaces de silicium modifiées à l'APTES ((3-Aminopropyl)triéthoxysilane) comme représenté sur la figure 3.14. Cette solution n'a pas encore pu être testée avec notre MIP.

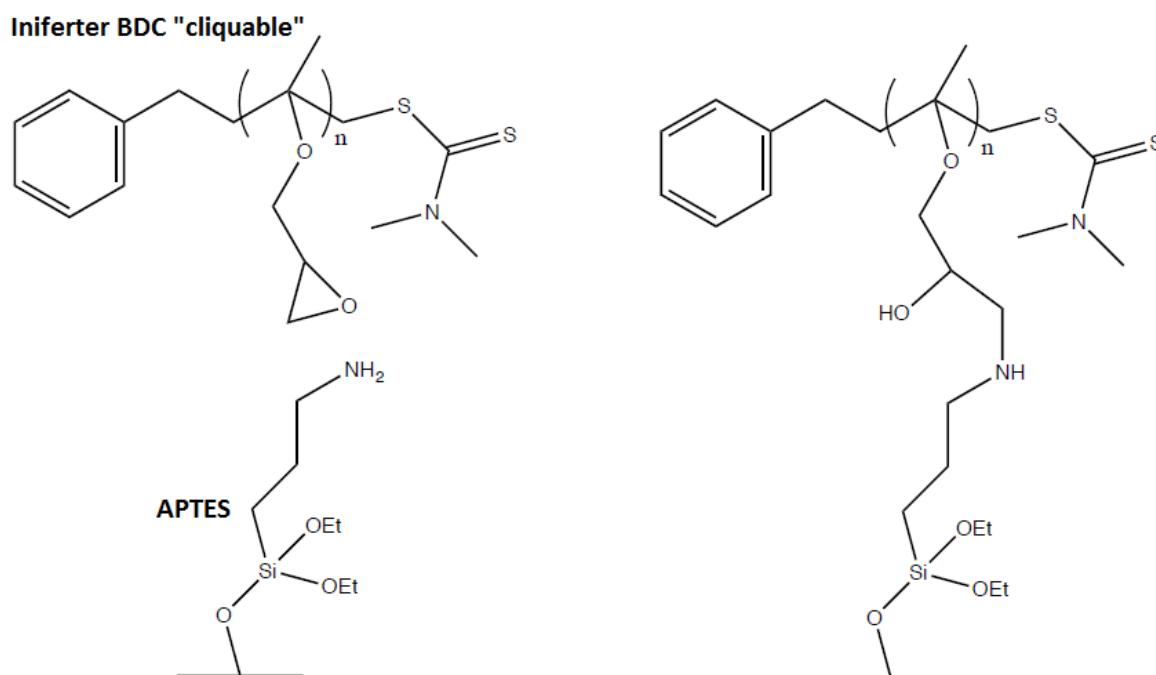


Figure 3.14 : Représentation de l'oligomère fonctionnel à base d'inifert BDC avant (gauche) et après sa liaison avec l'APTES (droite).

3.3 Développement d'un capteur pour la quantification de la S1P dans un fluide biologique

Pour répondre à l'objectif de la thèse, nous avons souhaité polymériser un MIP à la surface d'une fibre optique dans l'idée de réaliser la quantification de la S1P directement au sein d'un fluide biologique par des mesures de spectroscopie infrarouge par onde évanescente (*Fiber Evanescent Wave Spectroscopy FEWS*). Pour cela nous avons d'abord développé une technique de polymérisation de surface et le MIP-S1P obtenu a été testé par différentes méthodes qui ont été présentées dans la première partie de ce chapitre.

Dans cette dernière partie, nous présentons une étude bibliographique concernant la méthode de spectroscopie infrarouge par onde évanescente à la surface d'une fibre optique avant de s'intéresser aux résultats préliminaires qui ont été obtenus.

3.3.1 Spectroscopie infrarouge par onde évanescente à la surface d'une fibre optique (FEWS)

3.3.1.1 Spectroscopie dans l'infrarouge moyen

La spectroscopie dans l'infrarouge moyen ($2,5\ \mu\text{m} < \lambda < 25\ \mu\text{m}$ ou $4000\ \text{cm}^{-1} > \sigma = \frac{1}{\lambda} > 400\ \text{cm}^{-1}$ avec λ et σ respectivement la longueur d'onde et le nombre d'onde) est un outil très puissant pour l'analyse qualitative et quantitative de composés en phase gazeuse, liquide ou solide [152], [153].

Des molécules différentes possèdent des combinaisons de groupes vibrationnels différentes ce qui rend leur spectre d'absorption dans l'infrarouge moyen caractéristique. Ainsi, au sein d'un mélange d'espèces différentes, ces spectres peuvent être utilisés pour l'identification et l'étude d'une molécule en particulier.

Cette technique a déjà eu un énorme impact dans le domaine de la biologie et plus particulièrement de la médecine en permettant notamment l'identification puis la quantification d'espèces dans des fluides biologiques complexes [154], [155]. Il s'agit d'une technique sans marquage qui contrairement aux techniques basées sur les ultraviolets ou les rayons X couramment utilisées en biochimie et en médecine, présente l'avantage d'être non destructive et peut potentiellement être utilisée *in vivo*.

Cependant, les molécules d'eau possèdent une forte absorption dans l'infrarouge moyen et leur présence au sein de l'échantillon ou dans son environnement proche perturbe l'analyse, rendant les mesures difficiles à réaliser dans les milieux aqueux [156]. C'est la raison pour laquelle les mesures standards d'absorption dans l'infrarouge moyen sont effectuées sur des tranches d'échantillons très fines (entre 10 et 100 μm d'épaisseur) préalablement séchées puis placées à l'intérieur du spectromètre. Malheureusement il n'est pas toujours possible de préparer ainsi les échantillons et ce protocole n'est pas adapté à l'identification puis la quantification d'espèces au sein d'une solution biologique.

L'une des méthodes proposée pour surmonter cette difficulté est la spectroscopie par réflexion totale atténuée (spectroscopie ATR, de l'anglais *Attenuated Total Reflection*), parfois appelée spectroscopie par onde évanescente (EWS de l'anglais *Evanescent Wave Spectroscopy*) [157]–[159].

3.3.1.2 Spectroscopie par réflexion totale atténuée

Dans ce type de spectroscopie, l'absorption a lieu à l'interface entre l'échantillon et un élément sensible transparent, plutôt qu'au travers d'un échantillon très fin.

Afin de comprendre la spectroscopie ATR, considérons la propagation d'un faisceau de lumière dans un guide d'onde d'indice de réfraction n_1 placé dans un milieu d'indice de réfraction n_2 plus faible (voir figure 3.15 ci-dessous). Lorsque le faisceau incident R_i atteint l'interface entre les deux milieux (appelée dioptré), il donne en général naissance à un rayon réfléchi R_r et à un rayon transmis R_t (ou réfracté), qui seront situés dans le plan d'incidence défini par le rayon incident et la normale locale au dioptré. Le rayon réfléchi R_r est symétrique au rayon incident R_i par rapport à la normale ($\theta'_1 = \theta_1$) et l'angle de réfraction θ_2 est relié à l'angle d'incidence θ_1 par la loi de Snell-Descartes :

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (6)$$

Comme $n_1 > n_2$, le rayon transmis s'écarte de la normale (voir figure 3.15 a). Lorsque l'angle d'incidence θ_1 est supérieur ou égal à l'angle de réfraction limite donné par :

$$\theta_L = \arcsin \frac{n_2}{n_1}, \quad (7)$$

la réflexion est dite totale et le rayon réfracté n'existe pas (voir figure 3.15 b). Le faisceau lumineux se propage alors dans le guide d'onde par une série de réflexions totales internes à l'interface. L'interférence entre l'onde incidente et l'onde réfléchie donne naissance à une onde stationnaire dans le guide d'onde perpendiculairement à l'interface et à un champ évanescent dans le milieu d'indice n_2 (voir figure 3.15 b), dont le champ électrique E décroît exponentiellement avec la distance z à l'interface.

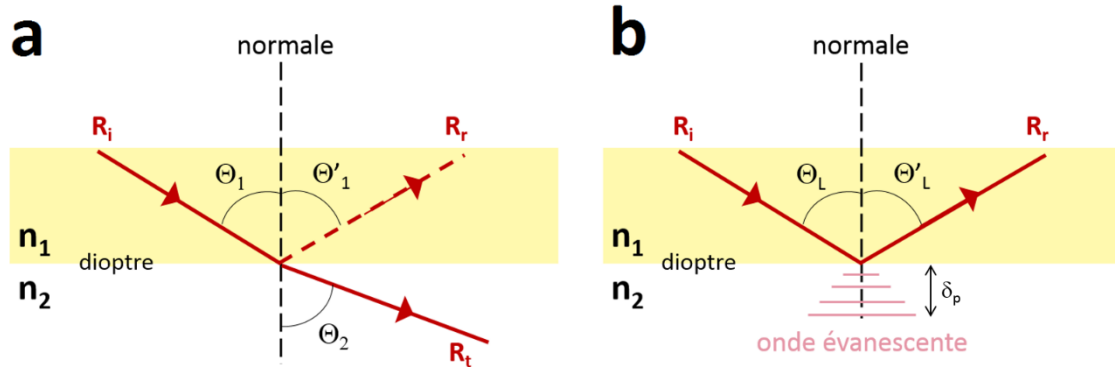


Figure 3.15 : Propagation d'un rayon lumineux dans un guide d'onde, cas où il existe un rayon réfléchi et un rayon transmis (a) et illustration de la réflexion totale (b).

Cette décroissance s'exprime par :

$$E_z = E_0 e^{-z/d_p}, \quad (8)$$

où d_p , la profondeur de pénétration du champ évanescent dans le milieu d'indice n_2 est donnée par :

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta_1 - (n_{21})^2}} \quad (9)$$

avec λ la longueur d'onde et $n_{21} = \frac{n_2}{n_1}$.

Généralement, la profondeur de pénétration d_p est de l'ordre de la longueur d'onde de la lumière dans le milieu d'indice n_2 .

Si l'onde évanescente est partiellement absorbée par le milieu d'indice n_2 à des longueurs d'onde spécifiques λ_i , on aura :

$$r(\lambda_i) < 1 \quad (10)$$

avec $r(\lambda_i)$ la réflectivité, c'est-à-dire la proportion de l'onde électromagnétique qui est réfléchiée à l'interface. On parlera alors de réflexion totale atténuée et ce phénomène est à la base de la spectroscopie ATR.

Il peut être démontré par ailleurs que :

$$r(\lambda_i) = 1 - \alpha(\lambda_i) d_e, \quad (11)$$

où d_e et $\alpha(\lambda_i)$ sont respectivement l'épaisseur et le coefficient d'absorption de la couche dans le milieu d'indice n_2 qui absorbe effectivement la lumière. Il est également admis que les mesures relatives à une même couche absorbante de coefficient d'absorption $\alpha(\lambda_i)$ et

d'épaisseur d_e seront identiques, que l'on utilise la spectroscopie ATR ou la spectroscopie de transmission classique.

Considérons maintenant la transmission de la lumière de longueur d'onde λ_i au sein du guide d'onde. La lumière y est transmise par une succession de réflexions totales internes et la réflectivité pour un nombre N de réflexions est donnée par :

$$R(\lambda_i) = 1 - N\alpha(\lambda_i) d_e, \quad (12)$$

où $A(\lambda_i) = N\alpha(\lambda_i) d_e$ est le coefficient d'absorption pour la longueur d'onde λ_i . Le tracé de la fonction $A(\lambda)$ correspondra au spectre de l'absorption générale du milieu d'indice n_2 . Si ce milieu correspond à l'échantillon d'étude (par exemple un fluide biologique) les pics dans le spectre d'absorption (ou inversement les creux dans le spectre de transmission) pour certaines longueurs d'onde seront caractéristiques des espèces présentes dans l'échantillon (par exemple des molécules biologiques) ce qui servira à les identifier. L'amplitude des pics sera proportionnelle à la concentration des espèces en solution, ce qui permettra de les quantifier.

Notons que la valeur de $A(\lambda_i)$ dépend de l'indice de réfraction n_2 et du nombre N de réflexions. Le nombre N dépend quant à lui de la géométrie de l'élément ATR. Il est proportionnel à sa longueur et inversement proportionnel à son épaisseur et à la tangente de l'angle d'incidence.

La spectroscopie ATR infrarouge a été utilisée avec succès dans de nombreuses applications dans le domaine biologique et médical, notamment pour la quantification de biomarqueurs de certaines pathologies dans les urines ou dans le sang [160]–[164]. Néanmoins, les systèmes de spectroscopie ATR classiques présentent deux inconvénients non négligeables. Tout d'abord, l'élément ATR doit normalement être placé dans un spectromètre infrarouge encombrant et les mesures ne peuvent pas se faire à distance, ce qui constitue une limitation majeure si l'objectif poursuivi est le développement d'un capteur transportable. D'autre part, la sensibilité des mesures dépend grandement du nombre de réflexions N et de l'angle d'incidence θ_1 , grandeurs relatives à la géométrie de l'élément ATR. En résumé, plus l'élément est long et fin et plus la sensibilité de mesure est élevée. Or, la plupart du temps, l'élément ATR employé dans les appareils classiques est relativement court et épais (par exemple un prisme). La perte de sensibilité qui en résulte peut constituer un problème majeur lorsque l'on souhaite quantifier une espèce présente en très faible concentration dans un fluide complexe [165]. Toutefois, ces deux inconvénients peuvent être dépassés grâce à l'utilisation d'une fibre optique en tant qu'élément ATR [166], [135]. C'est le principe de la spectroscopie par onde évanescente à la surface d'une fibre optique (FEWS de l'anglais *Fiber-Optic Evanescent Wave Spectroscopy*).

3.3.1.3 Spectroscopie par onde évanescente à la surface d'une fibre optique

3.3.1.3.1 Exemple d'applications dans le domaine médical et choix du type de fibre

Cette technique de spectroscopie permet la réalisation de mesures infrarouges dans des milieux biologiques avec une grande sensibilité. Parmi les exemples marquants de la littérature on pourra citer le travail de Goldberg et al., [167] dans lequel cette technique est utilisée pour l'analyse des tissus biologiques *in situ* et en temps réel dans le cadre de la détection du mélanome cutané, le travail pionnier de Osnat Eytan et al., [168] dans lequel ils quantifient plusieurs entités biologiques liées à des pathologies directement dans du sérum ou encore l'étude menée par l'équipe de Anne et al., en collaboration avec l'Hôpital Public de Rennes qui concerne la détection de fer dans le sérum d'un large groupe de patients atteints d'hémochromatose, une maladie héréditaire responsable d'une surcharge de fer dans l'organisme [169].

Les fibres optiques utilisées dans ces systèmes doivent présenter une bonne stabilité thermomécanique et surtout être transparentes dans la plus large gamme de l'infrarouge possible. Elles sont généralement en matériaux cristallins ou en verre. Trois familles de verre différentes (voir figure 3.16) sont couramment employées [170], [171]. Il s'agit des verres à base de silice, qui ont l'inconvénient d'être opaques pour des longueurs d'onde supérieures à 6 μm , des verres fluorés à base de fluorure de zirconium (ZrF_4), qui possèdent une large transmission allant de l'UV à 7 μm , mais qui ne peuvent pas être utilisés au-delà, et enfin des verres de chalcogénure (sulfure, séléniure, tellurure) qui contiennent en plus d'autres éléments tels que l'arsenic (As), le germanium (Ge), l'antimoine (Sb) et le gallium (Ga). Parmi ces dernières, les fibres en verre de séléniure ont une bonne stabilité thermique et sont particulièrement appropriées à la spectroscopie par onde évanescente pour la détection de molécules dans le domaine médical avec une gamme de transmission théorique pouvant aller de 2 à 12 μm , ce qui correspond aux domaines d'absorptions fondamentales causées par les vibrations des principales molécules biologiques. Malheureusement, leur propriété mécanique sont parfois assez pauvres et elles sont potentiellement toxiques [172]–[174].

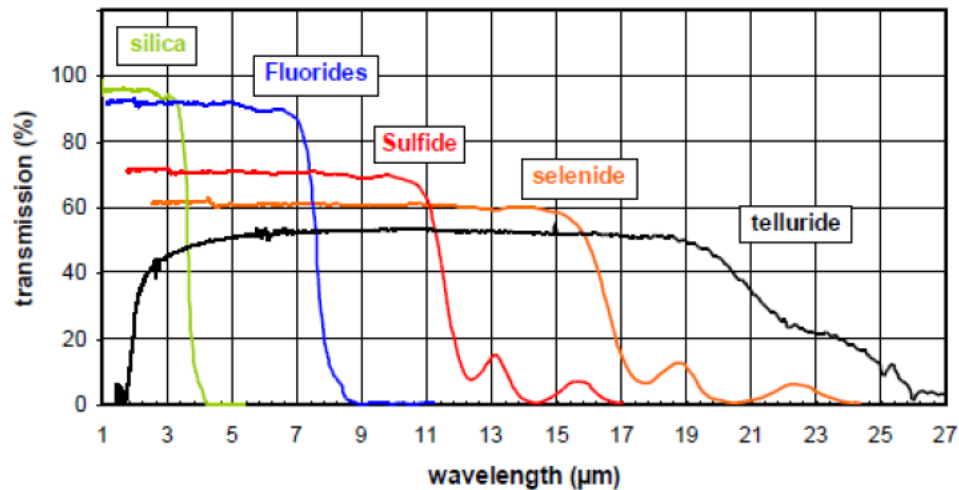


Figure 3.16 : Spectres de transmission dans l'infrarouge pour différents types de fibres

3.3.1.3.2 Augmentation des performances - Couplage avec les MIPs

Il est possible d'augmenter encore plus la sensibilité de mesure en agissant sur la géométrie des fibres optiques employées. En effet, comme évoqué précédemment, la réduction de l'angle d'incidence, qui conduit à une plus grande profondeur de pénétration de l'onde évanescente, et l'augmentation du nombre de réflexions dans la fibre, tendent à augmenter la sensibilité. C'est dans ce but que les fibres sont parfois étirées, aplaties, pliées en coude ou bien enroulées en spirale (voir figure 3.17).

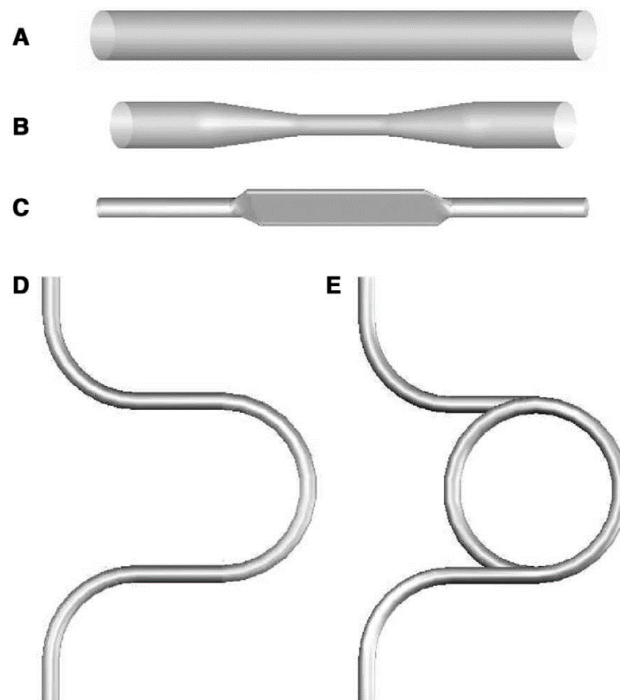


Figure 3.17 : Différentes modifications dans la géométrie de la fibre pouvant augmenter la sensibilité de la mesure.

Une autre méthode permettant d'augmenter la sensibilité existe. Il s'agit du recouvrement de la surface de la fibre optique par une couche de polymère hydrophobe qui empêche les molécules d'eau d'accéder jusqu'à la zone de l'échantillon exposé à l'onde évanescence, limitant ainsi les absorptions parasites dues aux molécules d'eau [175]–[177].

Il est tout à fait envisageable, que le polymère hydrophobe utilisé à cet effet soit un MIP avec pour avantage supplémentaire que seules les molécules cibles vont diffuser dans la couche et atteindre la région du champ évanescent, contrairement aux autres molécules de la solution. De plus, la molécule cible pourra être détectée et quantifiée par spectroscopie infrarouge. Les avantages des deux techniques sont ainsi cumulés et en plus de la sensibilité, la sélectivité de la méthode de mesure sera augmentée grâce au couplage avec le MIP [177].

Dans la littérature, deux exemples d'utilisation de MIP pour des mesures de spectroscopie par onde évanescence sont référencés. Le premier exemple connu date de 1999. Dans leur travail précurseur, Jakusch et al., [178] rapportent la préparation par la méthode non covalente d'une couche d'un MIP dirigé contre l'herbicide 2,4-D à la surface d'un élément ATR en sélénium et zinc, pour la mise au point d'un capteur chimique.

Le second exemple est plus récent (2015) et une fibre optique est utilisée en tant qu'élément ATR et comme transducteur d'un capteur biomimétique à base d'un MIP visant le *basic red 9*, un colorant textile présent au sein d'effluents industriels. Le polymère le MIP est d'abord préparé par polymérisation en masse puis immobilisé sur la surface de la fibre optique par *dip-coating* [179].

L'utilisation de la fibre optique offre également l'avantage de pouvoir réaliser la polymérisation du MIP *in situ* à la surface de la fibre optique, directement par l'application de l'onde évanescence, ce qui représente un moyen pratique et direct de coupler le MIP à la fibre optique tout en limitant sa manipulation [137].

3.3.2 Premières étapes dans le développement du capteur

3.3.2.1 Choix du matériel

Afin de développer le nouveau capteur nous avons commandé chez SelenOptic une fibre optique (fil de verre) en verre de chalcogénure à base d'arsenic et de sélénium (ArSe) d'un diamètre de 125 μm et transparente sur une gamme de longueurs d'onde allant de 2 à 9 μm (voir figure 3.18). Ce type de fibre a été choisi parce que la gamme de transmission est particulièrement bien adaptée à la détection de molécules dans le domaine médical.

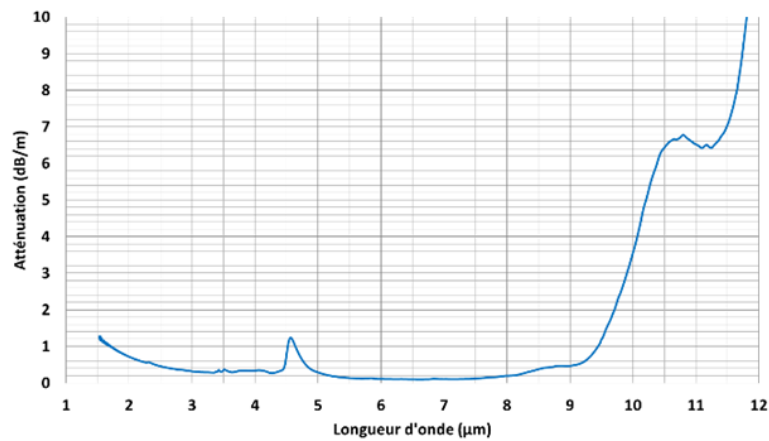


Figure 3.18 : Spectre d'atténuation en fonction de la longueur d'onde de la fibre optique ArSe.

Dans un premier temps, notre ambition était de connecter la fibre optique à un spectromètre infrarouge afin de bénéficier d'une source et d'un détecteur infrarouge de haute qualité. Nous avons identifié un module de couplage pour fibre optique commercial (Bruker) présent sur le site de l'ENSIACET à Toulouse et permettant de raccorder la fibre de façon déportée depuis d'un spectromètre Tensor 27 (voir figure 3.19).

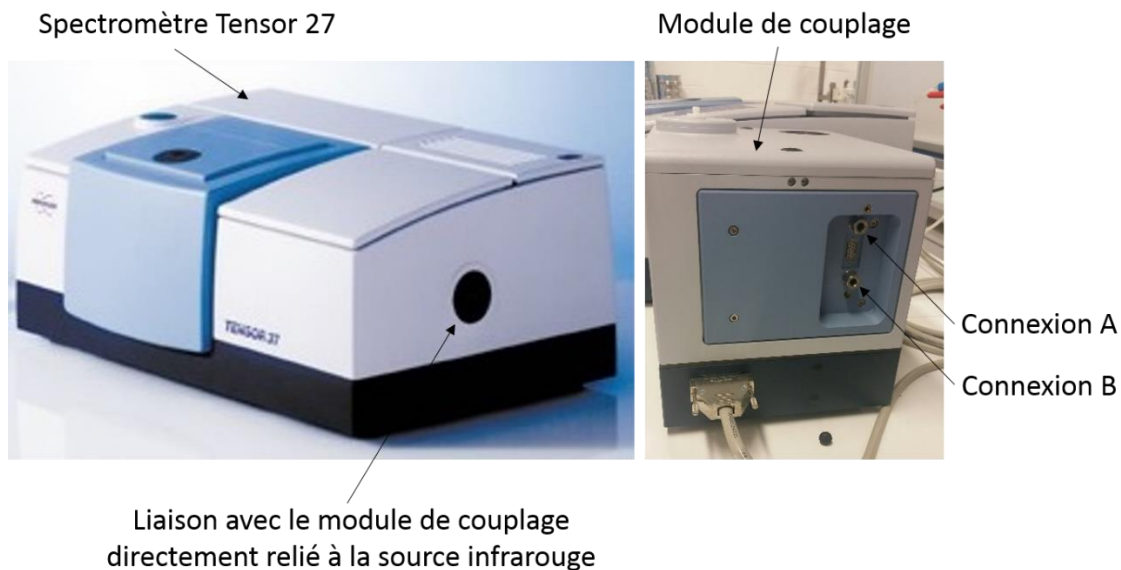


Figure 3.19 : Photographies du spectromètre et du module de couplage.

La source utilisée est celle du spectromètre alors qu'un détecteur est présent dans le module de couplage. Ce module dispose de deux connexions permettant de brancher la fibre. Les rayons infrarouges provenant de la source du spectromètre sont focalisés dans la fibre par un ensemble de miroirs et de lentilles, ils parcourent la fibre suite à de multiples réflexions totales internes puis retournent dans le module de couplage où ils sont envoyés vers le détecteur.

A terme la fibre optique pourra être connectée à une source et un détecteur miniaturisé de façon à rendre le capteur portable.

Pour la polymérisation du MIP à la surface de la fibre optique, il est possible d'aplatir une partie de la fibre optique de façon à pouvoir utiliser la méthode de photopolymérisation présentée dans la première partie de ce chapitre. Comme on l'a vu précédemment, l'aplatissement de la fibre permettrait aussi d'augmenter la sensibilité de la mesure mais les risques de casse de la fibre sont importants. Une autre possibilité serait de déposer la solution à la surface de la fibre optique par la méthode de *dip-coating* puis la polymériser aux UV dans une atmosphère contrôlée mais cette technique implique le déplacement de la fibre qui augmente les risques de pollution et de rupture de la fibre. Une option idéale serait d'installer la fibre déjà reliée à la source et au détecteur infrarouge dans un système de cuve contenant la solution de pré-polymérisation et d'effectuer la polymérisation par onde évanescente. La même cuve pourrait être utilisée comme contenant de la solution biologique.

3.3.2.2 Résultats préliminaires de spectroscopie infrarouge en mode ATR

Avant de développer le dispositif expérimental dédié à la spectroscopie infrarouge par fibre optique, nous avons souhaité réaliser des mesures préliminaires en spectroscopie infrarouge classique en utilisant le mode ATR dont le principe physique, nous l'avons vu, est commun à celui employé dans la spectroscopie par onde évanescente à la surface d'une fibre optique (FEWS).

Il nous a paru important de vérifier que la S1P avait bien une signature spectrale caractéristique dans l'infrarouge et de s'assurer que le spectre du MIP n'était pas superposé à celui de la S1P.

Le spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) Tensor 27 de chez Bruker équipé d'un module ATR (*Attenuated Total Reflectance*) diamant a été utilisé. Les spectres de transmittance (%) sur une gamme allant de 400 à 4000 cm^{-1} (nombre d'onde) ont été obtenus pour la S1P sous forme de poudre et pour le MIP-S1P photopolymérisé à la surface des échantillons de silicium. L'analyse de la S1P en solution aqueuse a aussi été réalisée mais sans succès, probablement à cause d'une sensibilité trop faible due à la présence en excès des molécules d'eau. Les résultats sont présentés dans la figure 3.20.

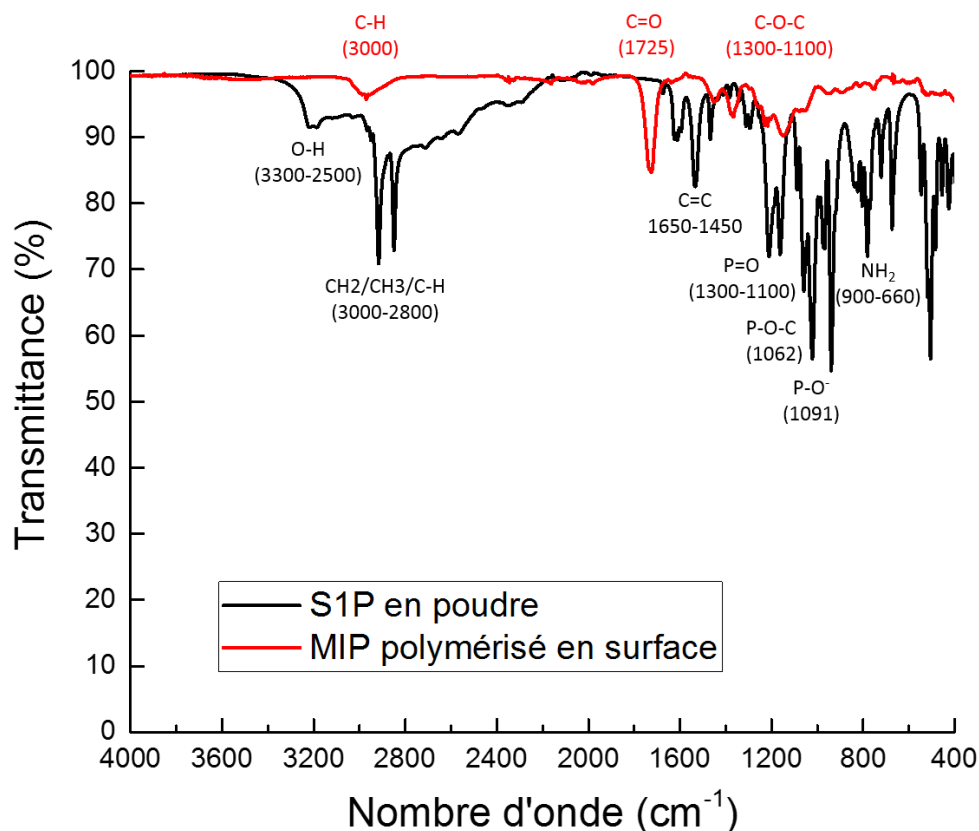


Figure 3.20 : Signature infrarouge de la S1P en poudre (noir) et du MIP-S1P polymérisé en surface.

Nous pouvons voir que les groupements chimiques de la S1P et du MIP sont clairement identifiables. Les pics infrarouges relatifs au groupe phosphate de la S1P sont de forte intensité et paraissent les plus adaptés à l'identification de la molécule. Avec ce résultat, nous pouvons aussi constater que les pics caractéristiques de la S1P ne sont pas présents dans le spectre du MIP polymérisé en surface ce qui prouve que l'étape d'extraction de la molécule *template* est bien efficace.

Toutefois, la question se pose de savoir si le spectre infrarouge de la S1P est suffisamment caractéristique pour permettre son identification au sein de mélange complexe, contenant notamment des molécules similaires. L'utilisation du MIP comme premier filtre de sélection pourrait être une solution mais malheureusement il est probable que les spectres des analogues structuraux potentiellement liés par le MIP soit similaires. Une grande sélectivité du MIP, lui permettant de reconnaître seulement la S1P serait donc nécessaire si l'on souhaite la quantifier par cette méthode.

3.4 Conclusions et perspectives

Dans le chapitre 3, nous avons réussi à rendre la formulation du MIP-S1P 1 photosensible et à mettre au point une méthode de photopolymérisation en 2D. Grâce à cette méthode nous avons pu polymériser le MIP à la surface de substrats en silicium puis tester ses propriétés de reconnaissance par deux méthodes de mesures dont l'une sans marquage.

Les résultats du test de liaison mesurés par microscopie de fluorescence suggèrent que le MIP-S1P est doté de propriétés de reconnaissance vis-à-vis de la S1P fluorescéine et qu'il est sélectif de la S1P fluorescéine par rapport à la fluorescéine seule. La liaison de la S1P fluorescéine au MIP est probablement due en majorité aux interactions entre la molécule cible et le monomère fonctionnel. La reconnaissance de forme, si elle intervient dans cette liaison ne peut pas être totale à cause de la présence du groupement fluorescéine. Justement, l'interprétation de nos résultats est basée sur l'hypothèse que la présence du groupement fluorescéine n'empêche pas la S1P fluorescéine d'interagir avec le monomère fonctionnel. Dans l'avenir, il faudrait être capable de valider cette hypothèse ou bien de réaliser les mêmes expériences avec un moyen de détection sans marquage. De plus, ces tests de liaison devraient être répétés avec un nombre plus important d'échantillons. La caractérisation en microscopie optique a montré que l'épaisseur des spots de MIP n'est pas parfaitement homogène, ce qui limite l'interprétation des résultats des tests de liaison. Il sera nécessaire de développer une nouvelle méthode de polymérisation en surface permettant de contrôler l'épaisseur et l'homogénéité des spots de MIP. Les méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée que l'on a présentées et qui sont en développement pourront être utilisées à cet effet. Afin de se rapprocher le plus possible des conditions d'utilisation finales du capteur, il faudra réduire la concentration d'incubation de S1P lors du test de liaison pour atteindre à terme une valeur de la gamme de concentration estimée de S1P libre (7,3 – 45 nM). Pour que les tests soient réalistes, il faudra les réaliser dans le plasma sanguin et en présence d'analogues structuraux.

L'utilisation de la QCM nous a permis de démontrer par une technique sans marquage les propriétés de reconnaissance du MIP-S1P pour la S1P. La S1P semble se lier préférentiellement à une surface de silicium recouverte de MIP plutôt qu'à une surface de silicium vierge (expérience n°1). De plus, les résultats de l'expérience n°2 laissent espérer l'instauration de liaisons spécifiques entre la S1P et le MIP. Cependant, le pourcentage de liaison maximale de S1P est faible (14 %) et cela pourrait s'expliquer par le fait que le nombre de sites de reconnaissance est diminué dans le cas d'une structuration en surface. Surtout, l'utilisation de la BSA pour la solubilisation de la S1P pose un gros problème d'interprétation des résultats. Notre hypothèse de base était que la BSA n'empêcherait pas totalement la S1P de se lier aux empreintes du MIP mais compte tenu de la taille de la BSA par rapport à celle de la S1P, cette hypothèse semble peu probable. Nous avons également considéré qu'il était possible de mesurer la part de la S1P dans la variation de fréquence observée, mais cette mesure se faisant toujours en présence de BSA, nous ne pouvons pas en avoir la preuve formelle. Ainsi, pour

pouvoir confirmer ces résultats, il faudrait réaliser des nouveaux tests de liaison avec une méthode de solubilisation permettant de s'affranchir de la BSA. Comme rappelé précédemment il serait aussi nécessaire de tester la sélectivité du MIP avec des analogues structuraux dans le plasma sanguin et avec des concentrations de S1P pertinentes. Malgré les doutes évoqués et bien que seulement qualitative, l'interprétation des courbes de variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence est instructive. Les résultats pourraient témoigner d'une différence de propriétés viscoélastiques de la couche engendrée par le passage de la S1P à la surface du capteur. Le type d'interaction de la solution de S1P avec le MIP semble différent de celui de la solution contrôle avec le même MIP ce qui pourrait traduire une interaction particulière entre la S1P et le MIP. Enfin, la liaison de la S1P dans les empreintes du MIP pourrait engendrer une augmentation de la rigidité de la matrice polymérique.

La méthode de spectroscopie par onde évanescente à la surface d'une fibre optique a été identifiée comme une méthode de détection théoriquement bien adaptée à nos objectifs. Cependant en pratique, des premières expériences avec la fibre optique ont montré qu'elle était difficilement manipulable à cause de sa fragilité. Malgré qu'elle soit transparente dans la région infrarouge attendue, cette fibre n'est définitivement pas la meilleure option d'un point de vue pratique, d'autant plus qu'elle est potentiellement toxique. Pour la polymérisation du MIP à la surface de la fibre, une méthode de *dip-coating* pourra être envisagée à condition de travailler sur la viscosité de la solution de pré-polymérisation et de pouvoir éviter la contamination à l'oxygène. Un dispositif expérimental tout-en-un, muni d'une cuve pourrait accueillir la fibre optique au moment de l'étape de polymérisation et de l'étape de test dans le plasma sanguin. Ceci permettrait de limiter le plus possible le transport de la fibre fragile. A plus long terme, il pourrait être envisagé de coupler la fibre avec une source et un détecteur infrarouge miniaturisée afin que le dispositif devienne portable et qu'il puisse être employé dans une application de type *point of care*.

La signature spectrale de la S1P dans l'infrarouge moyen a été obtenue avec succès par la méthode d'ATR mais nous craignons qu'elle soit peu caractéristique. En effet, les analogues structuraux de la S1P ont des signatures spectrales dans l'infrarouge très similaires voire identiques. Si la sélectivité du MIP ne parvient pas à être améliorée, cette limitation pourrait remettre en cause le choix de cette technique de mesure.

Conclusion générale

L'objectif de la thèse était de développer un capteur pour la quantification sélective de la forme libre de la S1P dans le plasma sanguin. Du fait du faible poids moléculaire de la S1P et des propriétés avantageuses des MIPs par rapport aux biorécepteurs biologiques, nous avons décidé d'utiliser un MIP en tant que couche sensible pour notre futur capteur. La mise au point de la formulation d'un MIP pour la S1P a constitué un défi surtout à cause de sa propriété amphiphile qui a rendu difficile sa solubilisation pour la préparation de la solution de pré-polymérisation et le choix du monomère fonctionnel.

Une nouvelle formulation d'un MIP-S1P a été obtenue et une méthode polymérisation en masse a été appliquée avec succès pour la préparation de ce MIP.

Les propriétés de reconnaissance du MIP-S1P pour la S1P ont été évaluées par LC-MS et une capacité de liaison d'environ 65 % a été obtenue. Les propriétés de reconnaissance du MIP-S1P pour la S1P fluorescéine ont également été évaluées par spectroscopie de fluorescence et une capacité de liaison similaire a été obtenue.

Pour des raisons pratiques, nous avons synthétisé un MIP avec une molécule « *dummy template* » dans le but de mener des optimisations. Ce MIP a été testé et une meilleure capacité de liaison pour la S1P fluorescéine a été obtenue. Grâce à l'optimisation des paramètres expérimentaux réalisée avec ce MIP, les performances du MIP-S1P pour la liaison à la S1P fluorescéine ont été améliorées.

Ces résultats semblent montrer qu'il y a bien une capacité de liaison du MIP-S1P pour la S1P fluorescéine mais ils posent la question du rôle de la propriété de reconnaissance du MIP attribuée aux empreintes. En effet, tous nos tests ont été réalisés avec la S1P fluorescéine, or sa structure n'est pas équivalente à celle de la S1P. La sélectivité du MIP-S1P semblait ainsi remise en cause.

Nous avons effectivement montré que la sélectivité du MIP-S1P n'était pas optimale, puisque le MIP est aussi capable de lier le céramide 1-phosphate qui est en plus fluorescent. La sélectivité était un critère fondamental dans notre objectif puisque le but était de quantifier une forme particulière, la forme libre de S1P, au sein d'un milieu biologique complexe, le plasma sanguin contenant plusieurs analogues structuraux de la S1P. Ainsi, nous avons tenté d'optimiser la formulation du MIP-S1P pour augmenter sa sélectivité mais seule une modification du solvant de test de liaison a permis de montrer une tendance positive. Toutefois, il s'agit d'un premier test et ce résultat devra être confirmé.

Dans un second temps, pour répondre au deuxième objectif du travail, nous avons identifié une technique de détection adaptée aux conditions d'utilisation de notre capteur. Nous avons

choisi la spectroscopie infrarouge par onde évanescente à la surface d'une fibre optique, parce qu'il s'agit d'une méthode sans marquage suffisamment sensible, qui peut être compatible avec une application médicale de type *point of care* et qui présente l'avantage de permettre une identification des molécules par leur signature infrarouge. De plus, il a déjà été démontré que le couplage d'un polymère avec la fibre optique avait pour conséquence d'augmenter la sensibilité de la mesure. Notre idée de base était de pouvoir, grâce à cette technique de mesure, distinguer la S1P parmi ses analogues structuraux éventuellement liés par le MIP. Malheureusement, il est probable que les analogues structuraux aient la même signature spectrale que la S1P.

Afin de préparer l'immobilisation du MIP-S1P à la surface en verre de la fibre optique nous avons travaillé pour rendre la formulation du MIP photosensible pour mettre en place une nouvelle méthode polymérisation du MIP-S1P en 2D, à la surface de substrats de silicium. Cette méthode a été développée avec succès et nous avons pu grâce à elle tester le MIP-S1P par microscopie de fluorescence et par microbalance à cristal de quartz. Les résultats des tests de liaison sont prometteurs, même s'ils sont à nuancer en raison de l'utilisation de la S1P fluorescéine ou de la S1P solubilisée dans la BSA. De plus, la caractérisation des couches de MIP a montré une inhomogénéité des dépôts qui peut être handicapante pour l'analyse des résultats des tests de liaison. C'est la raison pour laquelle nous avons commencé à développer des techniques de polymérisation radicalaire contrôlée de façon à mieux maîtriser l'épaisseur des dépôts. L'une des méthodes utilisées a démontré son efficacité et une autre solution très prometteuse est envisagée.

Nous pensons qu'il sera nécessaire de faire évoluer la formulation du MIP-S1P et surtout sa méthode de polymérisation, sans quoi la quantification de manière sélective de la S1P sous sa forme libre sera très difficile. Il faudra en priorité réaliser les tests de liaison dans le plasma sanguin, avec de la S1P non marquée et pour des concentrations pertinentes. Ce travail aura apporté un ensemble de premiers résultats prometteurs et il sera intéressant de le poursuivre.

Références bibliographiques

- [1] D. Hanahan and R. Weinberg, 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [2] La ligue contre le cancer, 'LE CANCER, DÉFINITION ET CHIFFRES - Qu'est-ce que le cancer ?', juin-2017. [Online]. Available: https://www.ligue-cancer.net/article/278_qu-est-ce-que-le-cancer-.
- [3] Fondation contre le Cancer, 'Qu'est-ce que le cancer?', 09-Nov-2016. [Online]. Available: <http://www.cancer.be/le-cancer/quest-ce-que-le-cancer>.
- [4] FONDATION ARC pour la RECHERCHE sur le CANCER, 'Qu'est-ce qu'un cancer ?', août-2016. [Online]. Available: <http://www.fondation-arc.org/Face-au-cancer/qu-est-ce-que-le-cancer.html>.
- [5] 'Layers of the skin with hair follicles', *la-piel.jpg*, 2013. [Online]. Available: <https://blog.cytoplan.co.uk/la-piel/>.
- [6] N. Salamé, 'La structure de la peau et les cellules pigmentaires de l'épiderme', mai-2016. [Online]. Available: <http://acces.ens-lyon.fr/evolution/evolution/accompagnement-pedagogique/accompagnement-au-lycee/terminale-2012/un-regard-sur-levolution-de-lhomme/evolution-dans-la-lignee-humaine/quelques-aspects-genetiques-de-levolution-des-populations-humaines-homo-sapiens-sapiens/Histoire%20evolutive%20de%20la%20pigmentation%20de%20la%20peau%20humaine/structure-de-la-peau/>.
- [7] M. Démarchez, 'Le mélanocyte et la pigmentation', Jan-2017. [Online]. Available: <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article12>.
- [8] INCa, 'Les traitements du mélanome de la peau', juillet-2016. .
- [9] 'This slide shows a melanoma on a patient's skin', *File:Melanoma.jpg*, 2011. [Online]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melanoma.jpg>.
- [10] 'Melanoma', *Dr. Kenton Busch - Dyersburg Skin and Allergy Clinic*, 2014. [Online]. Available: <http://dyersburgskinandallergyclinic.com/?p=311>.
- [11] 'Researchers Developed New Technology That Can Detect Skin Cancer At Early Stage', *researchers-developed-new-technology-can-detect-skin-cancer-early-stage*, 2016. [Online]. Available: <http://noisebreak.com/researchers-developed-new-technology-can-detect-skin-cancer-early-stage/>.
- [12] Haute Autorité de Santé, 'Mélanome cutané : la détection précoce est essentielle', Mar-2017. [Online]. Available: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1524070/fr/melanome-cutane-la-detection-precoce-est-essentielle.
- [13] Fondation contre le Cancer, 'Les nouveaux traitements anti-cancer', juin-2017. [Online]. Available: <http://www.cancer.be/les-cancers/jeunes-et-cancer/les-traitements/les-nouveaux-traitements-anti-cancer>.

- [14] Fondation contre le Cancer, 'Les biomarqueurs en cancérologie', juin-2017. [Online]. Available: <http://www.cancer.be/le-cancer/examens-m-dicaux/biomarqueurs/les-biomarqueurs-en-canc-rologie>.
- [15] P. Vereecken, F. Cornelis, N. Van Baren, V. Vandersleyen, and J.-F. Baurain, 'A Synopsis of Serum Biomarkers in Cutaneous Melanoma Patients', *Dermatol. Res. Pract.*, vol. 2012, pp. 1–7, 2012.
- [16] J. Solassol, B. Guillot, and T. Maudelonde, 'Les marqueurs pronostiques circulants du mélanome : profils protéomiques et études cliniques', *Ann Biol Clin*, vol. 69(2), pp. 151–7, 2011.
- [17] S. Spiegel and S. Milstien, 'Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid', *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 397–407, May 2003.
- [18] M. García-Pacios *et al.*, 'Sphingosine-1-Phosphate as an Amphipathic Metabolite: Its Properties in Aqueous and Membrane Environments', *Biophys. J.*, vol. 97, no. 5, pp. 1398–1407, Sep. 2009.
- [19] J. Fantini and N. Yahi, 'Sphingolipids', in *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease: Clues to Innovative Therapeutic Strategies for Brain Disorders*, Academic Press, 2015, p. 398.
- [20] J. L. W. Thudichum, *A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*. London: Bailliere, Tindall, and Cox., 1884.
- [21] S. T. Pruett *et al.*, 'Thematic Review Series: Sphingolipids. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols', *J. Lipid Res.*, vol. 49, no. 8, pp. 1621–1639, May 2008.
- [22] C. R. Gault, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, 'An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown', in *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*, Springer, 2010, pp. 1–23.
- [23] A. Morales, H. Lee, F. M. Goñi, R. Kolesnick, and J. C. Fernandez-Checa, 'Sphingolipids and cell death', *Apoptosis*, vol. 12, no. 5, pp. 923–939, May 2007.
- [24] A. H. Futerman and Y. A. Hannun, 'The complex life of simple sphingolipids', *EMBO Rep.*, vol. 5, no. 8, pp. 777–782, Aug. 2004.
- [25] R. Valaperta, 'Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts', *FASEB J.*, vol. 20, no. 8, pp. 1227–1229, Jun. 2006.
- [26] H. Le Stunff, I. Galve-Roperh, C. Peterson, S. Milstien, and S. Spiegel, 'Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis', *J. Cell Biol.*, vol. 158, no. 6, pp. 1039–1049, Sep. 2002.
- [27] Albinet, V., *et al.*, *Genetic disorders of simple sphingolipid metabolism. Handb Exp Pharmacol*, 2013(215): p. 127-52. .
- [28] O. Cuvillier, 'Les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate: De la biologie à la physiopathologie', *médecine/sciences*, vol. 28, no. 11, pp. 951–957, Nov. 2012.
- [29] M. Kohno *et al.*, 'Intracellular Role for Sphingosine Kinase 1 in Intestinal Adenoma Cell Proliferation', *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 19, pp. 7211–7223, Oct. 2006.
- [30] N. C. Hait *et al.*, 'Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate', *Science*, vol. 325, no. 5945, pp. 1254–1257, Sep. 2009.
- [31] S. M. Pitson *et al.*, 'Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation', *EMBO J.*, vol. 22, no. 20, pp. 5491–5500, 2003.
- [32] J. E. Chipuk *et al.*, 'Sphingolipid Metabolism Cooperates with BAK and BAX to Promote the Mitochondrial Pathway of Apoptosis', *Cell*, vol. 148, no. 5, pp. 988–1000, Mar. 2012.

- [33] H. Alshaker *et al.*, 'Therapeutic Potential of Targeting SK1 in Human Cancers', in *Advances in Cancer Research*, vol. 117, Elsevier, 2013, pp. 143–200.
- [34] B. Oskouian and J. D. Saba, 'Cancer Treatment Strategies Targeting Sphingolipid Metabolism', *Adv Exp Med Biol*, no. 688, pp. 185–205, 2010.
- [35] W. I. Leong and J. D. Saba, 'S1P metabolism in cancer and other pathological conditions', *Biochimie*, vol. 92, no. 6, pp. 716–723, Jun. 2010.
- [36] N. J. Pyne and S. Pyne, 'Sphingosine 1-phosphate and cancer', *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 7, pp. 489–503, Jul. 2010.
- [37] Y. Akao *et al.*, 'High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 342, no. 4, pp. 1284–1290, Apr. 2006.
- [38] C. Watson *et al.*, 'High Expression of Sphingosine 1-Phosphate Receptors, S1P1 and S1P3, Sphingosine Kinase 1, and Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2 Is Associated with Development of Tamoxifen Resistance in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients', *Am. J. Pathol.*, vol. 177, no. 5, pp. 2205–2215, Nov. 2010.
- [39] B. Visentin *et al.*, 'Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages', *Cancer Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 225–238, Mar. 2006.
- [40] B. Visentin *et al.*, 'Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages', *Cancer Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 225–238, Mar. 2006.
- [41] K. LaMontagne *et al.*, 'Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization', *Cancer Res.*, vol. 66, no. 1, pp. 221–231, 2006.
- [42] M. Bektas, P. S. Jolly, C. Müller, J. Eberle, S. Spiegel, and C. C. Geilen, 'Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression', *Oncogene*, vol. 24, no. 1, pp. 178–187, Jan. 2005.
- [43] V. Albinet *et al.*, 'Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells', *Oncogene*, vol. 33, no. 26, pp. 3364–3373, 2014.
- [44] M. Mrad *et al.*, 'Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma', *Oncotarget*, vol. 7, no. 44, p. 71873, 2016.
- [45] S. M. Hammad, M. M. Al Gadban, A. J. Semler, and R. L. Klein, 'Sphingosine 1-Phosphate Distribution in Human Plasma: Associations with Lipid Profiles', *J. Lipids*, vol. 2012, pp. 1–8, 2012.
- [46] K. Venkataraman *et al.*, 'Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient', *Biochem. J.*, vol. 397, no. 3, pp. 461–471, Aug. 2006.
- [47] A. V. Thuy, C.-M. Reimann, N. Y. A. Hemdan, and M. H. Gräler, 'Sphingosine 1-Phosphate in Blood: Function, Metabolism, and Fate', *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 34, no. 1, pp. 158–171, 2014.
- [48] R. L. Proia and T. Hla, 'Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy', *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 4, pp. 1379–1387, Apr. 2015.
- [49] M. B. A. Oldstone, J. R. Teijaro, K. B. Walsh, and H. Rosen, 'Dissecting influenza virus pathogenesis uncovers a novel chemical approach to combat the infection', *Virology*, vol. 435, no. 1, pp. 92–101, Jan. 2013.

- [50] N. MURATA *et al.*, 'Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions', *Biochem. J.*, vol. 352, no. 3, pp. 809–815, 2000.
- [51] K. Sattler and B. Levkau, 'Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection', *Cardiovasc. Res.*, vol. 82, no. 2, pp. 201–211, Nov. 2008.
- [52] C. Frej *et al.*, 'Quantification of sphingosine 1-phosphate by validated LC-MS/MS method revealing strong correlation with apolipoprotein M in plasma but not in serum due to platelet activation during blood coagulation', *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 28, pp. 8533–8542, Nov. 2015.
- [53] N. O'Brien *et al.*, 'Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies', *J. Lipid Res.*, vol. 50, no. 11, pp. 2245–2257, Nov. 2009.
- [54] R. Lalauze, *Capteurs chimiques, biocapteurs et biopuces*. Lavoisier, 2012.
- [55] D. Dezest, 'Nanosystèmes électromécaniques pour la biodétection: intégration d'un moyen de transduction et stratégies de biofonctionnalisation', INSA Toulouse, 2015.
- [56] L. Nicu, 'Biomechanical sensors from the macro to the nanoscale-the way forward', Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2008.
- [57] K. Haupt and K. Mosbach, 'Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors', *Chem. Rev.*, vol. 100, no. 7, pp. 2495–2504, Jul. 2000.
- [58] B. Mattiasson and L. Ye, Eds., *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*, vol. 150. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [59] M. V. Polyakov, 'Adsorption properties and structure of silica gel', *Zhur Fiz Khim*, vol. 2, pp. 799–805, 1931.
- [60] M. V. Polyakov, P. M. Stadnik, M. W. Paryckij, I. M. Malkin, and F. S. Duchina, 'On the structure of silica', *Zhur Fiz Khim*, pp. 454–456, 1933.
- [61] M. V. Polyakov, L. P. Kuleshina, and I. E. Neimark, 'On the dependence of silica gel adsorption properties on the character of its porosity', *Zhur Fiz Khim*, vol. 10, pp. 100–112, 1937.
- [62] F. H. Dickey, 'The preparation of specific adsorbents', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 35, no. 5, pp. 227–229, 1949.
- [63] H. S. Andersson and I. A. Nicholls, 'A historical perspective of the development of molecular imprinting', in *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*, 1st Edition, B. Sellergren., vol. 23, Elsevier Science, 2000, p. 582.
- [64] G. Wulff and A. Sarhan, 'Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates', *Angew. Chem.-Int. Ed.*, vol. 11, pp. 334–342, 1972.
- [65] T. Takagishi and I. M. Klotz, 'Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages', *Biopolymers*, vol. 11, no. 2, pp. 483–491, 1972.
- [66] R. Arshady and K. Mosbach, 'Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization', *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 182, no. 2, pp. 687–692, 1981.
- [67] B. Sellergren, M. Lepistö, and K. Mosbach, 'Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition', *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 17, pp. 5853–5860, 1988.

- [68] L. I. Anderson, D. J. O'Shannessy, and K. Mosbach, 'Molecular recognition in synthetic polymers: preparation of chiral stationary phases by molecular imprinting of amino acid amides', *J. Chromatogr. A*, vol. 513, pp. 167–179, 1990.
- [69] L. Fischer, R. Mueller, B. Ekberg, and K. Mosbach, 'Direct enantioseparation of beta.-adrenergic blockers using a chiral stationary phase prepared by molecular imprinting', *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 113, no. 24, pp. 9358–9360, 1991.
- [70] B. Sellergren and K. J. Shea, 'Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers', *J. Chromatogr. A*, vol. 635, no. 1, pp. 31–49, 1993.
- [71] G. Vlatakis, L. I. Andersson, R. Müller, and K. Mosbach, 'Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting', *Nature*, vol. 361, pp. 645–647, 1993.
- [72] 'AFFINISEP'. [Online]. Available: <http://www.affinisep.com/en/>.
- [73] 'AFFINILUTE™ MIP Columns'. [Online]. Available: <http://www.biotage.com/product-page/affinilute-mip-columns>.
- [74] 'SupelMIP Molecularly Imprinted Polymer SPE Cartridges'. [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/supelmip.html>.
- [75] F. Puoci *et al.*, *Molecularly imprinted polymers (PIMs) in biomedical applications*. INTECH Open Access Publisher, 2010.
- [76] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, and J. Li, 'Molecular imprinting: perspectives and applications', *Chem Soc Rev*, vol. 45, no. 8, pp. 2137–2211, 2016.
- [77] M. J. Whitcombe, N. Kirsch, and I. A. Nicholls, 'Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years 2004-2011: MOLECULAR IMPRINTING SCIENCE AND TECHNOLOGY: 2004-2011', *J. Mol. Recognit.*, vol. 27, no. 6, pp. 297–401, Jun. 2014.
- [78] K. Haupt, 'Peer reviewed: molecularly imprinted polymers: the next generation', *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 17, p. 376–A, 2003.
- [79] K. Haupt, A. V. Linares, M. Bompert, and B. T. S. Bui, 'Molecularly Imprinted Polymers', in *Molecular Imprinting*, vol. 325, K. Haupt, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 1–28.
- [80] C. Algieri, E. Drioli, L. Guzzo, and L. Donato, 'Bio-Mimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Membranes', *Sensors*, vol. 14, no. 8, pp. 13863–13912, Jul. 2014.
- [81] K. J. Shea and E. A. Thompson, 'Template Synthesis of Macromolecules. Selective Functionalization of an Organic Polymer', *J. Org. Chem.*, vol. 43, no. 21, pp. 4253–4255, 1978.
- [82] M. Bompert, K. Haupt, and C. Ayela, 'Micro and Nanofabrication of Molecularly Imprinted Polymers', in *Molecular Imprinting*, vol. 325, K. Haupt, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 83–110.
- [83] M. J. Whitcombe, M. Rodriguez Esther, P. Villar, and E. N. Vulfson, 'A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol', *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, pp. 7105–7111, 1995.
- [84] K. Karim *et al.*, 'How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers?', *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 12, pp. 1795–1808, Dec. 2005.
- [85] X. Fu, Q. Yang, Q. Zhou, Q. Lin, and C. Wang, 'Template-Monomer Interaction in Molecular Imprinting: Is the Strongest the Best?', *Open J. Org. Polym. Mater.*, vol. 05, no. 02, pp. 58–68, 2015.

- [86] G. Vasapollo *et al.*, 'Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 12, pp. 5908–5945, Sep. 2011.
- [87] K. Karim, T. Cowen, A. Guerreiro, E. Piletska, M. J. Whitcombe, and others, 'A Protocol for the Computational Design of High Affinity Molecularly Imprinted Polymer Synthetic Receptors. *Glob J Biotechnol Biomater Sci* 3 (1): 001-007', *Life Sci. Group*, 2017.
- [88] H. Yan and K. H. Row, 'Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 155–178, 2006.
- [89] X. Song, J. Wang, and J. Zhu, 'Effect of porogenic solvent on selective performance of molecularly imprinted polymer for quercetin', *Mater. Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 299–304, 2009.
- [90] W. A. Braunecker and K. Matyjaszewski, 'Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives', *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 1, pp. 93–146, Jan. 2007.
- [91] J. Chiefari *et al.*, 'Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process', *Macromolecules*, vol. 31, no. 16, pp. 5559–5562, 1998.
- [92] T. Otsu, 'Iniferter concept and living radical polymerization', *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, vol. 38, no. 12, pp. 2121–2136, 2000.
- [93] A. Biffis, G. Dvorakova, and A. Falcimaigne-Cordin, 'Physical Forms of MIPs', in *Molecular Imprinting*, vol. 325, K. Haupt, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 29–82.
- [94] A. G. Mayes and K. Mosbach, 'Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase', *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 21, pp. 3769–3774, 1996.
- [95] D. Vaihinger, K. Landfester, I. Kräuter, H. Brunner, and G. E. Tovar, 'Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerisation', *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 203, no. 13, pp. 1965–1973, 2002.
- [96] L. Ye, R. Weiss, and K. Mosbach, 'Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Microspheres', *Macromolecules*, vol. 33, no. 22, pp. 8239–8245, Oct. 2000.
- [97] A. Poma, A. Guerreiro, M. J. Whitcombe, E. V. Piletska, A. P. F. Turner, and S. A. Piletsky, 'Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with a Reusable Template-“Plastic Antibodies”', *Adv. Funct. Mater.*, vol. 23, no. 22, pp. 2821–2827, Jun. 2013.
- [98] X.-A. Ton *et al.*, 'A Versatile Fiber-Optic Fluorescence Sensor Based on Molecularly Imprinted Microstructures Polymerized in Situ', *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, no. 32, pp. 8317–8321, Aug. 2013.
- [99] D. Derrien and S. Bayouhd, 'Polymères à empreintes moléculaires, intérêts et application pour l'analyse', *Spectra Anal. Rev. Sci. Dactualite Sur Tech. Linst*, vol. 37, no. 260, p. 30, 2008.
- [100] G. Wulff, 'Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates-A Way towards Artificial Antibodies', *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 34, p. 1812, 1995.
- [101] G. Ertürk and B. Mattiasson, 'Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors', *Sensors*, vol. 17, no. 2, p. 288, Feb. 2017.
- [102] H. Zhang, 'Water-compatible molecularly imprinted polymers: Promising synthetic substitutes for biological receptors', *Polymer*, vol. 55, no. 3, pp. 699–714, Feb. 2014.

- [103] B. Li, J. Xu, A. J. Hall, K. Haupt, and B. Tse Sum Bui, 'Water-compatible silica sol-gel molecularly imprinted polymer as a potential delivery system for the controlled release of salicylic acid: CONTROLLED RELEASE OF SALICYLIC ACID BY A SOL-GEL MIP', *J. Mol. Recognit.*, vol. 27, no. 9, pp. 559–565, Sep. 2014.
- [104] C. Pegoraro, D. Silvestri, G. Ciardelli, C. Cristallini, and N. Barbani, 'Molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) membranes for the specific recognition of phospholipids', *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 4, pp. 748–755, Dec. 2008.
- [105] R. Jang, K. H. Kim, S. A. Zaidi, W. J. Cheong, and M. H. Moon, 'Analysis of phospholipids using an open-tubular capillary column with a monolithic layer of molecularly imprinted polymer in capillary electrochromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry', *ELECTROPHORESIS*, vol. 32, no. 16, pp. 2167–2173, Aug. 2011.
- [106] P. Narayanaswamy *et al.*, 'Lipidomic "Deep Profiling": An Enhanced Workflow to Reveal New Molecular Species of Signaling Lipids', *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 6, pp. 3043–3047, Mar. 2014.
- [107] J. Wang *et al.*, 'Templated polymers enable selective capture and release of lysophosphatidic acid in human plasma via optimization of non-covalent binding to functional monomers', *The Analyst*, vol. 140, no. 22, pp. 7572–7577, 2015.
- [108] R. Sulc *et al.*, 'Phospholipid imprinted polymers as selective endotoxin scavengers', *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 44299, Mar. 2017.
- [109] I. Ten-Doménech, H. Martínez-Pérez-Cejuela, M. J. Lerma-García, E. F. Simó-Alfonso, and J. M. Herrero-Martínez, 'Molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction of phospholipids from human milk samples', *Microchim. Acta*, vol. 184, no. 9, pp. 3389–3397, Sep. 2017.
- [110] R. Jang, K. H. Kim, S. A. Zaidi, W. J. Cheong, and M. H. Moon, 'Analysis of phospholipids using an open-tubular capillary column with a monolithic layer of molecularly imprinted polymer in capillary electrochromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry', *ELECTROPHORESIS*, vol. 32, no. 16, pp. 2167–2173, Aug. 2011.
- [111] S. Nestora *et al.*, 'Plastic Antibodies for Cosmetics: Molecularly Imprinted Polymers Scavenge Precursors of Malodors', *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 55, no. 21, pp. 6252–6256, May 2016.
- [112] M. Panagiotopoulou *et al.*, 'Molecularly Imprinted Polymer Coated Quantum Dots for Multiplexed Cell Targeting and Imaging', *Angew. Chem.*, vol. 128, no. 29, pp. 8384–8388, Jul. 2016.
- [113] [Online]. Available: <http://www.echelon-inc.com/index.php?module=Products&func=detail&id=229>.
- [114] [Online]. Available: <http://www.echelon-inc.com/index.php?module=Products&func=detail&id=217>.
- [115] S. Beyazit *et al.*, 'Versatile Synthetic Strategy for Coating Upconverting Nanoparticles with Polymer Shells through Localized Photopolymerization by Using the Particles as Internal Light Sources', *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 53, no. 34, pp. 8919–8923, Aug. 2014.
- [116] J. S. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge, and D. B. Collum, 'Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry', *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, no. 46, pp. 11998–12013, Nov. 2013.

- [117] K. A. Connors, *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*. John Wiley & Sons, 1987.
- [118] P. Thordarson, 'Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry', *Chem Soc Rev*, vol. 40, no. 3, pp. 1305–1323, 2011.
- [119] G. Wulff, T. Gross, and R. Schönfeld, 'Enzyme models based on molecularly imprinted polymers with strong esterase activity', *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 36, no. 18, pp. 1962–1964, 1997.
- [120] G. Wulff and R. Schönfeld, 'Polymerizable amidines—adhesion mediators and binding sites for molecular imprinting.', *Adv. Mater.*, no. 10 (12), pp. 957–959, 1998.
- [121] G. Wulff and K. Knorr, 'Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting', *Bioseparation*, vol. 10, no. 6, pp. 257–276, 2001.
- [122] L. I. Anderson, 'Application of Molecular Imprinting to the Development of Aqueous Buffer and Organic Solvent Based Radioligand Binding Assays for (S)-Propranolol', *Anal Chem*, no. 68, pp. 111–117, 1996.
- [123] H. F. EL-Sharif, D. M. Hawkins, D. Stevenson, and S. M. Reddy, 'Determination of protein binding affinities within hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs)', *Phys Chem Chem Phys*, vol. 16, no. 29, pp. 15483–15489, 2014.
- [124] A. Murray and B. Örmeci, 'Application of molecularly imprinted and non-imprinted polymers for removal of emerging contaminants in water and wastewater treatment: a review', *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 19, no. 9, pp. 3820–3830, Nov. 2012.
- [125] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Passini, P. Baravalle, and G. Giraudi, 'A Connection between the Binding Properties of Imprinted and Nonimprinted Polymers: A Change of Perspective in Molecular Imprinting', *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 3, pp. 1513–1518, Jan. 2012.
- [126] A. Molinelli, J. O'Mahony, K. Nolan, M. R. Smyth, M. Jakusch, and B. Mizaikoff, 'Analyzing the Mechanisms of Selectivity in Biomimetic Self-Assemblies via IR and NMR Spectroscopy of Prepolymerization Solutions and Molecular Dynamics Simulations', *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 16, pp. 5196–5204, Aug. 2005.
- [127] J. O'Mahony, A. Molinelli, K. Nolan, M. R. Smyth, and B. Mizaikoff, 'Towards the rational development of molecularly imprinted polymers: ¹H NMR studies on hydrophobicity and ion-pair interactions as driving forces for selectivity', *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 9, pp. 1884–1893, Mar. 2005.
- [128] B. Mattiasson and G. Ertürk, 'Why Using Molecularly Imprinted Polymers in Connection to Biosensors?', *Sensors*, vol. 17, no. 2, p. 246, Jan. 2017.
- [129] L. Ye and K. Mosbach, 'Molecular imprinting: synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors', *Chem. Mater.*, vol. 20, no. 3, pp. 859–868, 2008.
- [130] M. Cieplak and W. Kutner, 'Artificial Biosensors: How Can Molecular Imprinting Mimic Biorecognition?', *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 922–941, Nov. 2016.
- [131] B. Jakoby, G. M. Ismail, M. P. Byfield, and M. J. Vellekoop, 'A novel molecularly imprinted thin film applied to a Love wave gas sensor', *Sens. Actuators Phys.*, vol. 76, no. 1, pp. 93–97, 1999.
- [132] F. L. Dickert, P. Forth, P. Lieberzeit, and M. Tortschanoff, 'Molecular imprinting in chemical sensing—Detection of aromatic and halogenated hydrocarbons as well as polar solvent vapors', *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 360, no. 7–8, pp. 759–762, 1998.
- [133] T. Takeuchi and A. Kugimiya, 'Molecularly Imprinted Polymer-Coated Quartz Crystal Microbalance for Detection of Biological Hormone', *Electroanalysis*, vol. 11, p. 1158, 1999.

- [134] K. Haupt, K. Noworyta, and W. Kutner, 'Imprinted polymer-based enantioselective acoustic sensor using a quartz crystal microbalance', *Anal. Commun.*, vol. 36, no. 11–12, p. 391, 1999.
- [135] P. H. Paul and G. Kychakoff, 'Fiber-optic evanescent field absorption sensor', *Appl. Phys. Lett.*, vol. 51, no. 1, pp. 12–14, Jul. 1987.
- [136] S. Simhony, E. M. Kosower, and A. Katzir, 'Novel attenuated total internal reflectance spectroscopic cell using infrared fibers for aqueous solutions', *Appl. Phys. Lett.*, vol. 49, no. 5, pp. 253–254, Aug. 1986.
- [137] Y. Fuchs, A. V. Linares, A. G. Mayes, K. Haupt, and O. Soppera, 'Ultrathin Selective Molecularly Imprinted Polymer Microdots Obtained by Evanescent Wave Photopolymerization', *Chem. Mater.*, vol. 23, no. 16, pp. 3645–3651, Aug. 2011.
- [138] Y. Fuchs, O. Soppera, and K. Haupt, 'Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications—A review', *Anal. Chim. Acta*, vol. 717, pp. 7–20, Mar. 2012.
- [139] C. Ayela, F. Vandevelde, D. Lagrange, K. Haupt, and L. Nicu, 'Combining Resonant Piezoelectric Micromembranes with Molecularly Imprinted Polymers', *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, no. 48, pp. 9271–9274, Dec. 2007.
- [140] F. Vandevelde, T. Leïchlé, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, and K. Haupt, 'Direct Patterning of Molecularly Imprinted Microdot Arrays for Sensors and Biochips', *Langmuir*, vol. 23, no. 12, pp. 6490–6493, Jun. 2007.
- [141] H. Lalo, C. Ayela, E. Dague, C. Vieu, and K. Haupt, 'Nanopatterning molecularly imprinted polymers by soft lithography: a hierarchical approach', *Lab. Chip*, vol. 10, no. 10, p. 1316, 2010.
- [142] T. Alava *et al.*, 'Parallel acoustic detection of biological warfare agents surrogates by means of piezoelectric immunochips', *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 138, no. 2, pp. 532–538, May 2009.
- [143] M. Annaka, C. Yahiro, K. Nagase, A. Kikuchi, and T. Okano, 'Real-time observation of coil-to-globule transition in thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) brushes by quartz crystal microbalance', *Polymer*, vol. 48, no. 19, pp. 5713–5720, Sep. 2007.
- [144] J. Kandel, H.-S. Lee, P. Sobolewski, N. Tomczyk, R. J. Composto, and D. M. Eckmann, 'Chemically grafted fibronectin for use in QCM-D cell studies', *Biosens. Bioelectron.*, vol. 58, pp. 249–257, Aug. 2014.
- [145] J. Mertens, E. Finot, M.-H. Nadal, V. Eyraud, O. Heintz, and E. Bourillot, 'Detection of gas trace of hydrofluoric acid using microcantilever', *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 58–65, Apr. 2004.
- [146] G. A. McCubbin *et al.*, 'QCM-D fingerprinting of membrane-active peptides', *Eur. Biophys. J.*, vol. 40, no. 4, pp. 437–446, Apr. 2011.
- [147] M. Shahmiri, M. Enciso, and A. Mechler, 'Controls and constraints of the membrane disrupting action of Aurein 1.2', *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, Dec. 2015.
- [148] S. Praporski, A. Mechler, F. Separovic, and L. L. Martin, 'Subtle Differences in Initial Membrane Interactions Underpin the Selectivity of Small Antimicrobial Peptides', *ChemPlusChem*, vol. 80, no. 1, pp. 91–96, Jan. 2015.
- [149] B. Rückert, A. J. Hall, and B. Sellergren, 'Molecularly imprinted composite materials via iniferter-modified supports', *J Mater Chem*, vol. 12, no. 8, pp. 2275–2280, 2002.
- [150] D. Lakshmi *et al.*, 'Electrochemical Sensor for Catechol and Dopamine Based on a Catalytic Molecularly Imprinted Polymer-Conducting Polymer Hybrid Recognition Element', *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 9, pp. 3576–3584, May 2009.

- [151] B. Sellergren, B. Rückert, and A. J. Hall, 'Layer-by-Layer Grafting of Molecularly Imprinted Polymers via Iniferter Modified Supports', *Adv. Mater.*, vol. 14, no. 17, pp. 1204–1208, 2002.
- [152] H. Gunzler and H. U. Gremlich, *IR Spectroscopy, An Introduction*, Wiley-VCH, Weinheim. Germany, 2002.
- [153] B. H. Stuart, *Infrared spectroscopy : Fundamentals and Applications*, John Wiley and Sons. New York, 2004.
- [154] H.-U. Gremlich and B. Yan, *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. New York: Mercel Dekker, 2001.
- [155] W. Petrich, 'MID-INFRARED AND RAMAN SPECTROSCOPY FOR MEDICAL DIAGNOSTICS', *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 36, no. 2–3, pp. 181–237, Jun. 2001.
- [156] S. Y. Venyaminov and F. G. Prendergast, 'Water (H₂O and D₂O) Molar Absorptivity in the 1000–4000 cm⁻¹ Range and Quantitative Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions', *Anal. Biochem.*, no. 248, pp. 234–245, 1997.
- [157] J. Fahrenfort, 'Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds', *Spectrochim. Acta*, vol. 17, no. 7, pp. 698–709, 1961.
- [158] N. J. Harrick, *Internal Reflection Spectroscopy*, John Wiley and Sons. New York, 1967.
- [159] F. M. Mirabella, *Internal Reflection Spectroscopy: Theory and Applications (Practical Spectroscopy)*, CRC Press. 1992.
- [160] J. Wang, M. Sowa, H. H. Mantsch, A. Bittner, and H. M. Heise, 'Comparison of different infrared measurement techniques in the clinical analysis of biofluids', *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 15, no. 7, pp. 286–296, 1996.
- [161] H. Fabian, P. Lasch, and D. Naumann, 'Analysis of biofluids in aqueous environment based on mid-infrared spectroscopy', *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 3, pp. 031103–03110310, 2005.
- [162] J. J. Baraga, M. S. Feld, and R. P. Rava, 'Detection of atherosclerosis in human artery by mid-infrared attenuated total reflectance', *Appl. Spectrosc.*, vol. 45, no. 4, pp. 709–711, 1991.
- [163] H. M. Heise, G. Voigt, P. Lampen, L. Küpper, S. Rudloff, and G. Werner, 'Multivariate calibration for the determination of analytes in urine using mid-infrared attenuated total reflection spectroscopy', *Appl. Spectrosc.*, vol. 55, no. 4, pp. 434–443, 2001.
- [164] S. Mordechai *et al.*, 'Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma', *J. Microsc.*, vol. 215, no. 1, pp. 86–91, 2004.
- [165] Y. Raichlin and A. Katzir, 'Fiber-Optic Evanescent Wave Spectroscopy in the Middle Infrared', *Appl. Spectrosc.*, vol. 62, no. 2, pp. 55–72, Feb. 2008.
- [166] 'simhony1986.pdf'.
- [167] I. Goldberg *et al.*, 'Infrared fiber optic spectroscopy: a novel tool for skin diagnosis', 2004, p. 44.
- [168] O. Eytan, B.-A. Sela, and A. Katzir, 'Fiber-optic evanescent-wave spectroscopy and neural networks: application to chemical blood analysis', *Appl. Opt.*, vol. 39, no. 19, pp. 3357–3360, 2000.
- [169] M.-L. Anne *et al.*, 'Fiber evanescent wave spectroscopy using the mid-infrared provides useful fingerprints for metabolic profiling in humans', *J. Biomed. Opt.*, vol. 14, no. 5, p. 054033, 2009.
- [170] J. Sanghera and I. D. Aggarwal, *Infrared Fiber Optics*, Illustrée. CRC Press, 1998.

- [171] J. A. Harrington, *Infrared Fibers and Their Applications*. Bellingham, WA: SPIE Press Monograph, 2003.
- [172] S. Cui *et al.*, 'From Selenium- to Tellurium-Based Glass Optical Fibers for Infrared Spectroscopies', *Molecules*, vol. 18, no. 5, pp. 5373–5388, May 2013.
- [173] B. Bureau *et al.*, 'Recent advances in chalcogenide glasses', *J. Non-Cryst. Solids*, vol. 345–346, pp. 276–283, Oct. 2004.
- [174] S. Cui *et al.*, 'Selenide and telluride glasses for mid-infrared bio-sensing', 2014, p. 893805.
- [175] B. Mizaikoff, 'Mid-IR Fiber-Optic SENSORS', *Anal. Chem.*, vol. 258-A.
- [176] R. Simhi, D. Bunimovich, B.-A. Sela, and A. Katzir, 'Fiber optic evanescent wave spectroscopy (FEWS) and its applications for multicomponent analysis of blood and biological fluids', in *Photonics West'95*, 1995, pp. 493–500.
- [177] Y. Raichlin and A. Katzir, 'Fiber-Optic Evanescent Wave Spectroscopy in the Middle Infrared', *Appl. Spectrosc.*, vol. 62, no. 2, p. 55A–72A, Feb. 2008.
- [178] M. Jakusch, M. Janotta, B. Mizaikoff, K. Mosbach, and K. Haupt, 'Molecularly Imprinted Polymers and Infrared Evanescent Wave Spectroscopy. A Chemical Sensors Approach', *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 20, pp. 4786–4791, Oct. 1999.
- [179] M. V. Foguel, X.-A. Ton, M. V. B. Zanoni, M. D. P. T. Sotomayor, K. Haupt, and B. Tse Sum Bui, 'A molecularly imprinted polymer-based evanescent wave fiber optic sensor for the detection of basic red 9 dye', *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 218, pp. 222–228, Oct. 2015.